

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 799**

51 Int. Cl.:

G01J 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012** **E 12187618 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 2579085**

54 Título: **Microscopio láser de barrido no lineal flexible para la detección tridimensional no invasiva**

30 Prioridad:

08.10.2011 DE 102011115944

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**JENLAB GMBH (100.0%)
Strasse zum Müggelhort 36
12559 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**KÖNIG, KARSTEN y
WEINIGEL, MARTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 712 799 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 láser de barrido no lineal flexible para la detección tridimensional no invasiva

- 5 La invención se refiere a un microscopio láser de barrido no lineal para la detección tridimensional no invasiva flexible, en particular en materia animada (*in vivo*), preferentemente en la piel de animales, en plantas y en cultivos celulares, así como en materia inanimada, tal como por ejemplo minerales, materiales textiles y obras de arte. Por un microscopio láser de barrido no lineal o microscopio de excitación multifotónica (MP) se ha de entender en lo sucesivo siempre un microscopio con excitación de dos o más fotones.
- 10 Se conocen microscopios de dos fotones y tomógrafos multifotónicos (MPT), en los que se excitan señales de fluorescencia y SHG (generación de segundo armónico, *Second Harmonic Generation*) en moléculas biológicas *in vivo* mediante radiación láser pulsada en el intervalo infrarrojo cercano y se detectan mediante receptores altamente sensibles y rápidos adecuados (por ejemplo, documentos US 5 034 613 A, DE 201 17 294 U1; DE 203 06 122 U1).
- 15 Además se pueden representar componentes no fluorescentes y sin actividad de SHG, tales como agua y lípidos, mediante microscopios CARS y tomógrafos CARS (CARS – Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, *Dispersión Raman Anti-Stokes Coherente*) (véase, por ejemplo, el documento DE 10 2010 047 578 A1 no publicado previamente).
- 20 Con estos tomógrafos y microscopios ópticos no lineales se consiguen resoluciones horizontales en el intervalo submicrométrico y áreas de barrido (áreas de objeto) de algunos cientos de micrómetros en tres dimensiones.
- Tales tomógrafos y microscopios no lineales se basan en el uso de estructuras rígidas y disposiciones de mesa ópticas con amortiguación de vibraciones. Se pueden hacer funcionar como disposiciones de microscopio óptico vertical o invertido. Sin embargo, no se conoce ningún sistema de formación de imágenes de alta resolución (con resolución lateral alrededor de 1 μm y por debajo) para la tomografía o microscopía no lineal, que con la resolución lateral y axial requerida en el intervalo submicrométrico permita una colocación libre del cabezal de medición.
- 25 Una transmisión de haz requerida para ello se puede realizar mediante sistemas de fibra óptica o como sistema de transmisión de haz libre. La precisión de sistemas de transmisión de láser de haz libre, tal como se conocen por ejemplo en forma de brazos articulados de espejo, se ve influida por desviaciones mecánicas, tensiones mecánicas y variación de temperatura dentro de la estructura de jaula mecánica de estos brazos. La influencia sobre el eje mecánico del brazo articulado de espejo (por ejemplo, por variación de la temperatura) conduce, con diferentes constelaciones del brazo articulado, a una desviación de la posición de la radiación láser en la salida del brazo articulado con respecto a la posición diana o eje mecánico, de tal manera que un barrido fiable de un objeto de medición mediante óptica de enfoque de alta resolución con diferentes alineaciones del cabezal de medición es posible solo de manera limitada. Las variaciones de la posición de la radiación láser en la salida del brazo articulado óptico se pueden resumir con la expresión “precisión del sistema de transmisión”.
- 30 Además, la precisión de la transmisión del haz láser se ve influida por la longitud dada de la trayectoria del haz óptico de un brazo articulado y la estabilidad de la posición del haz (inglés *pointing stability*, estabilidad de puntería) del láser.
- 35 En este caso se ha de denominar estabilidad de puntería el cambio de la estabilidad de dirección de la radiación láser en la salida directa del láser, que resulta por la influencia de causa térmica de la configuración de resonador del láser.
- 40 El acoplamiento de la radiación láser en un brazo articulado de espejo es particularmente crítico. Se da un acoplamiento óptimo cuando el eje óptico de la radiación láser coincide con el eje (de entrada) mecánico del brazo articulado (colinealidad). Las desviaciones que aparecen en este caso influyen en la precisión además de las desviaciones de causa mecánica y térmica que se han mencionado anteriormente del propio brazo articulado.
- 45 En el caso del uso de ópticas de transmisión de fibra se reducen las desviaciones que se deben compensar en la conducción del haz ciertamente en exclusiva al acoplamiento y desacoplamiento del haz, sin embargo, sigue existiendo el problema fundamental de la desviación indeseada del haz láser en el lugar diana. En particular, también existe el riesgo de un acoplamiento indeseado en la cubierta de fibra (“*cladding*”, recubrimiento).
- 50 Por el documento US 5.463.215 A se conoce un dispositivo para la alineación de un haz de luz con el fin de su acoplamiento en una fibra óptica, en el que una parte del haz láser que no se acopla en el diámetro de fibra se desacopla a través de dos espejos cónicos anulares, que están dispuestos como retrorreflectores, así como un espejo que rota con 45° sobre un anillo, a un equipo de detector. Mediante sincronización del detector con la posición del espejo giratorio se puede detectar entonces una desviación de la colinealidad del eje de láser y de fibra así como un desenfoque. Además se requiere una iluminación cubriente de la entrada de fibra (es decir, diámetro de haz mayor que diámetro de fibra) y, por tanto, es inevitable ya desde el principio una pérdida de intensidad.
- 55 Por el documento DE 20 2010 009 249 U1 se conoce una disposición para la formación de imágenes de MPT que, a

través de un brazo articulado óptico flexible, garantiza una libre colocación en el espacio de un cabezal de medición, conteniendo el cabezal de medición la óptica para la guía del haz y la detección de fotones. Mediante un ajuste activo de haz con control en línea se debe poder conseguir una calidad óptima de la imagen en cualquier posición del cabezal de medición. Acerca del tipo y la forma del ajuste del haz, no obstante, no se realiza ningún tipo de indicación, de tal manera que no está disponible un sistema de medición automática para la estabilización del haz.

Por tanto, por el estado de la técnica se desprenden las siguientes desventajas:

- para la implementación de un microscopio flexible, la estabilización del haz debido a las tolerancias mecánicas de los sistemas de guía de haz es demasiado grande para garantizar la suficiente constancia de la iluminación de un punto de medición para la irradiación reproducible del área de barrido para una resolución submicrométrica mediante observación visual y reajuste en línea y
- en la microscopía multifotónica, la limitación de la formación de imágenes a la detección de la autofluorescencia de sustancias del propio cuerpo y la multiplicación de frecuencia no lineal de determinadas moléculas no es suficiente, habiéndose podido realizar la combinación deseable con sistemas CARS debido a las altas exigencias a la colinealidad hasta la fecha solo en sistemas rígidos.

Por tanto, la invención se basa en el objetivo de hallar una realización para microscopio láser de barrido no lineal, que se pueda utilizar de forma flexible, móvil, para la detección tridimensional no invasiva para exámenes no lineales de alta resolución multivalentes, en particular de piel, tejidos en la región urogenital, en la cavidad oral y en la zona ocular del cuerpo humano, pero también en plantas, animales, en cultivos celulares y en materia inanimada, que permita una iluminación reproducible automática de la óptica de enfoque con flexibilidad ilimitada del cabezal de medición. Como un planteamiento de objetivos ampliado se debe poder realizar una aplicación simultánea coincidente reproducible de dos trayectorias de haz con el fin de la combinación de diferentes procedimientos de medición, preferentemente de tomografía MP y CARS, en un cabezal de medición flexible común.

De acuerdo con la invención se resuelve el objetivo mediante un microscopio láser de barrido no lineal flexible de acuerdo con la reivindicación 1.

Ventajosamente, el al menos un espejo orientable controlable es accionado mediante al menos un soporte de espejo a base de un principio de accionamiento del grupo de reguladores capacitivos, inductivos o piezoeléctricos, motor paso a paso o motor de corriente continua.

A este respecto, el al menos un espejo orientable controlable se puede realizar de forma apropiada mediante un soporte de espejo de dos ejes o mediante dos de un eje.

Como posición diana para la alineación estabilizada de al menos un haz de excitación se selecciona ventajosamente la pupila de entrada de la óptica de enfoque o de otro elemento óptico de apertura limitada.

Resulta apropiado que el divisor de haz para la generación del haz de ensayo en función de la guía de haz del al menos un haz de excitación en el cabezal de medición esté configurado como divisor de haz de reflexión o de transmisión. El divisor de haz para el desacoplamiento del haz de ensayo puede estar configurado ventajosamente al mismo tiempo como espejo dicróico para el acoplamiento colineal de dos haces de excitación diferentes.

El fotodiodo para la detección del haz de ensayo como equivalente del haz de excitación en la posición diana es preferentemente un fotodiodo circular. Sin embargo, como alternativa se pueden emplear también formas de detector rectangulares u otras. Ventajosamente, con el fotodiodo al mismo tiempo que una regulación de la estabilidad del haz en la óptica de transmisión se puede determinar y corregir la estabilidad de puntería del láser.

El sistema de detector para la radiación secundaria emitida del objeto de medición está configurado preferentemente con un detector para la formación de imágenes por MPT o SHG, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes, que a través de un brazo articulado óptico flexible de escasa precisión mecánica permite una colocación a libre discreción del cabezal de medición en el espacio y garantiza una formación de imágenes por MPT reproducible.

El sistema de detector para la radiación secundaria puede estar configurado de forma particularmente ventajosa con varios detectores para la formación de imágenes por MPT, SHG y para CARS, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes y no fluorescentes en materia animada que, a través de un brazo articulado óptico flexible común, permite una colocación a libre discreción del cabezal de medición empleado en común en el espacio y genera una formación de imágenes simultánea y en el mismo lugar a partir de señales de MPT, SHG y CARS. A este respecto, el sistema de diagnóstico combinado de este modo para sustancias fluorescentes y no fluorescentes puede permitir también, de forma apropiada, a través de un brazo articulado óptico flexible y una fibra óptica independiente la colocación a libre discreción del cabezal de medición empleado en común en el espacio. Además es posible realizar en el sistema del diagnóstico combinado flexible a través de dos fibras ópticas independientes una colocación a libre discreción del cabezal de medición común para la formación de imágenes simultánea y en el mismo lugar.

Además, el sistema de detector para la radiación secundaria en una variante compacta puede presentar un detector de medición común para la formación de imágenes por MPT y para la formación de imágenes por CARS, estando previstos medios para la interrupción temporal de la excitación CARS, que permiten una separación de la formación de imágenes por MPT con respecto a una representación de señal combinada.

5 Preferentemente, el sistema de detector para un recuento de fotón individual con correlación temporal presenta detectores TCSPC para la formación de imágenes por MPT. A este respecto, el sistema de detector está equipado de forma apropiada con un diodo de disparo adicional, que aprovecha un reflejo de lado posterior de un divisor de haz previsto para el desacoplamiento de señal de medición en el cabezal de medición.

10 En una realización ventajosa del microscopio láser de barrido flexible, el cabezal de medición está apoyado mecánicamente por un brazo de apoyo flexible, que se puede bloquear en una posición discrecional, en un aparato de base móvil, que lleva consigo de forma obligada la óptica de transmisión, estando presentes en el aparato de base al menos una fuente de radiación para la generación de una radiación de excitación pulsada, una unidad óptica para la sincronización de la radiación de excitación pulsada y alineación con al menos una óptica de transmisión al cabezal de medición así como la unidad de control para la estabilización de dirección de la radiación de excitación en el cabezal de medición y una unidad de evaluación para el procesamiento de las señales transmitidas por el sistema de detector del cabezal de medición para la representación de formación de imágenes con una unidad de visualización.

15 La invención se basa en la consideración de que en general existen dos posibilidades para conseguir la precisión de una transmisión de haz flexible en brazos articulados de espejo, en concreto mediante el uso de sistemas de jaula optomecánicas la mayoría de las veces de gran volumen, pesados y caros o mediante el uso de una estabilización de dirección exigente de la radiación láser.

20 La invención resuelve estos requisitos divergentes con una estabilización de dirección tecnológicamente sencilla, con eficiencia en cuanto a costes y de volumen pequeño para radiación láser (o incluso radiación incoherente), que para la minimización de la desviación presenta un detector, una unidad de control y un accionador. En función de la desviación detectada en un plano diana conjugado en el interior de un cabezal de medición flexible de manera ilimitada mediante la unidad de control (circuito lógico sencillo) se efectúa una corrección de la dirección de haz del haz láserico, antes de que el mismo se acople en el sistema de iluminación y registro (óptica de enfoque) del cabezal de medición. Al mismo tiempo, mediante esta estabilización de haz se asegura también la colinealidad de la radiación de medición cuando se usan varios haces de excitación.

25 Por ello se reducen las exigencias planteadas a una estructura de jaula mecánica de un brazo articulado de espejo con respecto a la precisión necesaria de la guía de haz y los ahorros resultantes en volumen y peso facilitan la flexibilidad y movilidad del sistema de medición microscópico (por ejemplo, de un tomógrafo). Las ventajas de la estabilización de dirección, tales como por ejemplo forma constructiva compacta y de volumen pequeño y eficiencia en cuanto a costes, se pueden ver en particular en el acoplamiento de fibra en sistemas de transmisión de fibra.

30 La solución de acuerdo con la invención además se caracteriza por que se puede examinar un punto de objeto que se debe examinar por un sistema de formación de imágenes microscópico con cabezal de medición flexible mediante diferentes procedimientos de medición al mismo tiempo, tales como por ejemplo mediante microscopía CARS, microscopía SHG y/o microscopía de fluorescencia multifotónica de alta resolución. A este respecto, los diferentes rayos de excitación de uno o varios láseres de pulso corto se pueden transmitir a través del mismo brazo articulado óptico flexible o un brazo articulado óptico flexible y una fibra óptica adicional o a través de dos fibras ópticas y se pueden acoplar y regular con el mismo equipo para la estabilización del haz.

35 Con la invención es posible realizar un microscopio láser de barrido no lineal flexible compacto para la detección tridimensional no invasiva para exámenes de formación de imágenes con resolución micrométrica que permite una iluminación reproducible del objeto de medición con flexibilidad ilimitada del cabezal de medición. Además se pueden combinar trayectorias de haz de diferentes procedimientos de medición, preferentemente de microscopía CARS, microscopía SHG y/o microscopía de fluorescencia multifotónica en un cabezal de medición flexible común y a este respecto se puede realizar la misma iluminación reproducible y barrido con precisión de punto (con precisión de celda).

40 A continuación se va a explicar con más detalle la invención mediante ejemplos de realización. Para esto, los dibujos muestran:

60 la Fig. 1: una representación del principio de la invención para la alineación de un haz láserico a un punto diana en un cabezal de medición mediante el uso de un brazo articulado de espejo como sistema de conducción de haz;

65 la Fig. 2: una representación del principio de detección para la desviación de haz en un plano diana conjugado mediante el uso de un fotodiodo circular;

la Fig. 3: una representación tridimensional de la realización de la invención como microscopio láser de barrido que se puede emplear de forma multivalente, móvil, con cabezal de medición que se puede colocar libremente en el espacio para exámenes por tomografía en piel humana;

5 la Fig. 4: una representación esquemática de una realización de la invención en un microscopio láser de barrido flexible con dos sistemas de detección mediante el uso de un brazo articulado de espejo empleado de forma común como sistema de conducción de haz al cabezal de medición, que está alineado para exámenes en un objeto de medición vertical (posición 90°), tal como por ejemplo sustancias inanimadas en un cuadro;

10 la Fig. 5: una representación esquemática de una realización de la invención en un microscopio láser de barrido flexible con dos sistemas de detección mediante el uso de un brazo articulado de espejo y una fibra óptica como sistemas de conducción de haz al cabezal de medición común, que está orientado para examinar tejido vivo de animales, por ejemplo de un ratón, en posición normal (0°),

15 la Fig. 6: una representación esquemática de una realización de la invención en un tomógrafo con dos sistemas de detección mediante el uso de dos fibras ópticas como sistemas de conducción de haz para el cabezal de medición común que está orientado para examinar sustancias discrecionales, por ejemplo en solución líquida en una placa de Petri como microscopio invertido (posición 180°).

20 La Fig. 1 muestra la estructura básica del sistema. Un láser 1, preferentemente un láser de modo único (modo transversal) con un perfil de haz circular (o incluso un perfil de haz divergente, tal como por ejemplo haces lásericos elípticos o multimodales), envía un haz láserico 11 a un espejo orientable 2 ajustable, con el que se acopla el haz láserico 11 en una óptica de transmisión 3 y se conduce a una posición diana 41 en el interior de un cabezal de medición 4. Del haz láserico 11 mediante un divisor de haz 42 dispuesto en el cabezal de medición 4 se desacopla una pequeña parte (por ejemplo < 10 %) como haz de ensayo 43 a un fotodetector de resolución espacial 5. La posición del fotodetector de resolución espacial 5 está dispuesta de forma conjugada con una posición diana 41, de tal manera que el fotodetector 5 es sensible a desviaciones de la ubicación del perfil de haz 13 (solo mostrado en la Fig. 2) del haz láserico 11 (o del haz de ensayo 43 desacoplado del mismo) de una ubicación normal o media. Esto significa que el haz de ensayo 43 con respecto al haz láserico 11 presenta un eje óptico divergente (por ejemplo con el ángulo de 90°).

Una unidad de control 6 (que se puede realizar como una unidad lógica sencilla) evalúa la señal de salida del fotodetector 5 y controla, en función de la desviación del haz de ensayo 43 (centro o punto central de potencia del perfil de haz 13, tal como se representa en la Fig. 2) de la posición media del fotodetector, 5 la alineación angular del espejo orientable 2 ajustable a una maximización de la señal del fotodetector.

En la Fig. 2 está representado el fotodetector de resolución espacial 5 como un único fotodiodo circular 51 de gran superficie dentro de un cuadrado sombreado. Sin embargo, existe una pluralidad de posibilidades adicionales para la detección de desviaciones de ubicación del perfil de haz 13 del haz láserico 11. Esto se puede realizar mediante detectores de medición con resolución espacial, tal como un fotodiodo de cuadrante, mediante dos diodos de efecto lateral dispuestos de forma ortogonal (inglés *position sensitive device* – PSD), líneas de detector dispuestas de forma cruzada (CCD – inglés *charge-coupled device* o CMOS – inglés *complementary metal oxid semiconductor*), una matriz CCD o CMOS, estando realizadas las matrices de sensor bidimensionales con elementos de superficie interconectados (*binning*) de forma circular o se produce un alojamiento de forma integrada con interacción con una fibra guiaondas. Además, se pueden emplear sistemas de detector más bien poco frecuentes con una hendidura movida (inglés *scanning slit detector*).

En el caso del cambio de la posición angular del espejo orientable 2 ajustable (según la Fig. 1) se desvía el perfil de haz 13 (en el presente documento supuestamente circular) del haz láserico 11 en el interior del cuadrado sombreado. Con una superposición parcial de las áreas del perfil de haz 13 y del fotodetector 5, que debería estar configurada ventajosamente de manera correspondiente al perfil de haz 13 circular como fotodiodo circular 51, se genera una señal de salida que se basa en la corriente fotoeléctrica generada por la radiación láser incidente del fotodetector 5.

El objetivo de la disposición de acuerdo con la Fig. 1 es un centrado permanente del perfil de haz 13 en el centro del fotodetector 5. La posición del perfil de haz 13 está definida en este caso por las coordenadas X e Y dentro de un sistema de coordenadas cartesiano, que está asignado a la posición ideal del haz láserico 11 en la posición diana 41 del cabezal de medición 4. El mismo sistema de coordenadas está asignado a la posición conjugada en la que está dispuesto el fotodetector 5 y representa la base de la detección de la desviación del haz. El origen del sistema de coordenadas cartesiano de la posición diana 41 en la Fig. 1 se correlaciona con el centro del fotodiodo circular 51, ya que el mismo está dispuesto en un plano conjugado con respecto a la posición diana 41.

La señal de salida del fotodetector 5 se produce por una superposición dependiente de la posición o plegado de la distribución de sensibilidad del fotodiodo circular 51 con la función de intensidad del perfil de haz 13, tal como se representa en la Fig. 2 por ejemplo como distribución gaussiana aproximada para la componente de señal 52 en la

5 coordenada X y como componente de señal 53 cualitativamente del mismo tipo en la coordenada Y dentro del cuadrado sombreado (sistema de coordenadas supuesto). Como consecuencia de la división de la señal de salida en componentes X e Y, la posición del perfil de haz 13 se puede modificar mediante la desviación angular del espejo orientable 2 ajustable y se puede ajustar paso a paso (por ejemplo, en primer lugar para la coordenada X y después para la Y para la maximización de la señal de fotodiodo).

10 Una desviación del perfil de haz 13 en dirección X de un sistema de coordenadas cartesiano genera una componente de señal 52 dependiente de la posición con un máximo 521 global. La amplitud de la componente de señal 52 depende de la superposición del perfil de haz 13 (circular) y del fotodiodo circular 51 o, dicho de forma más exacta, del plegado de la función de intensidad del haz láserico 11 con la función de sensibilidad del fotodiodo 51. El ángulo de desviación perteneciente al máximo 521 del haz láserico 11 representa la coordenada buscada en dirección X. Con ello queda establecida y alineada la posición de corrección buscada del eje X del espejo orientable 2. Partiendo de esta coordenada X, una desviación en dirección ortogonal (del eje Y del sistema de coordenadas) conduce a una segunda componente de señal 53 del fotodiodo circular 51, cuyo máximo 531 se correlaciona con la coordenada buscada en dirección Y. La posición de corrección buscada del eje Y del espejo orientable 2 se establece de este modo y se puede alinear correspondientemente el espejo orientable 2. La amplitud de la componente de señal 53 como consecuencia del primer movimiento de seguimiento por la superposición ampliada de perfil de haz 13 y área de fotodiodo 51 con respecto a la componente de señal 52 queda ampliada o maximizada.

20 Para un perfil de haz 13 gaussiano circular ideal y un fotodiodo circular 51 ideal es suficiente un único establecimiento de las coordenadas. En este caso, después de la aproximación a las coordenadas en dirección X e Y, el origen del sistema de coordenadas cartesiano de la posición diana 41 se correlaciona con el centro o el punto central del perfil de haz 13.

25 Para un perfil de haz 13 no ideal (divergente de gaussiano circular) o un fotodetector 51 no circular se tiene que repetir varias veces el proceso del hallazgo de coordenadas en dirección X e Y. Entonces, el resultado de la primera alineación se puede comprobar de nuevo en el haz de ensayo 43 y dado el caso se puede reajustar de nuevo el espejo orientable 2.

30 Mediante una aplicación múltiple del proceso de centrado, por consiguiente, aparte de los perfiles de haz circulares (modo único) se pueden centrar también los denominados perfiles de haz 13 multimodales o incluso no simétricos a la posición diana 41 (aproximación iterativa). En este caso no se alinea el centro de un perfil de haz 13 circular ideal, sino el punto central de intensidad del perfil de haz 13. Con ayuda de la información de las dos componentes de señal 52 y 53 del fotodiodo circular 51 en las coordenadas X e Y, mediante la unidad de control 6 se alinea el espejo orientable 2 ajustable de tal modo que la señal del fotodiodo 51 aumenta y, por tanto, el perfil de haz 13 (o su punto central de intensidad) se desplaza al centro del plano diana 41.

40 Para precisiones máximas de este principio de regulación, las componentes de señal 52 y 53 deben presentar un máximo 521 o 531 sin meseta.

45 Esto se puede realizar mediante el cotejo del diámetro del fotodiodo circular 51 con el diámetro del perfil de haz 13, debiendo ser el diámetro del fotodiodo 51 el doble del radio de haz con $1/e^2$ de la intensidad del haz láserico 1. Otra posibilidad de establecer con la mayor precisión posible el máximo 521 o 531 de la componente de señal 52 o 53 es un procesamiento de señal posterior (por ejemplo, adaptación gaussiana o filtrado por paso bajo). Esto permite el funcionamiento del sistema incluso con fuentes de radiación láser de coherencia larga, en las que la señal mediante reflejo múltiple en divisores de haz presenta interferencias.

50 El intervalo dinámico de las componentes de señal 52 y 53 se puede aumentar mediante el uso de amplificadores logarítmicos (no dibujados), lo que garantiza la función de la estabilización de dirección incluso en el caso de láseres con potencia de salida variable.

55 Para la generación del haz de ensayo 43 se puede aprovechar la reflexión (tal como se muestra en la Fig. 1) o la transmisión del haz láserico 11 en el divisor de haz 42 (como se dibuja en la Fig. 4) en función de la dirección en la que se debe conducir posteriormente el haz láserico 11 en el cabezal de medición 4.

60 En el caso del uso de ópticas de transmisión de fibra (tal como existen en la Fig. 5) se ve influido el acoplamiento del haz láserico 11 y, por consiguiente, la transmisión del sistema por variación térmica y tensiones mecánicas dentro de la unidad óptica 72. Si se usan fibras monomodales, cuyo diámetro de núcleo es muy pequeño, la transmisión en el intervalo de solo unos pocos minutos puede disminuir varias decenas en porcentaje. En este caso se puede producir aparte de una potencia de láser insuficiente en el cabezal de medición 4 una destrucción del sistema de transmisión de fibra por interacciones térmicas en el interior de la fibra, que se deben evitar necesariamente.

65 El principio de acción de la corrección del haz láserico 11 o de su centrado en el núcleo de una óptica de transmisión de fibra se realiza de forma análoga a la representación de la Fig. 1, pudiendo estar representada la función del fotodiodo circular 51 descrito en la Fig. 2 por el diámetro de núcleo circular de la óptica de transmisión 3 configurada como fibra y un fotodetector 5 conectado por detrás, que integra toda la luz transmitida. La fibra guíaondas 32 imita a

este respecto junto con un fotodetector 5 colocado por detrás de forma discrecional una función descrita para la regulación con el fotodiodo circular 51 de acuerdo con la Fig. 1 y la Fig. 2 de forma equivalente.

Ejemplo de realización 1

Tal como se representa en la Fig. 3, el sistema de medición como microscopio de barrido no lineal flexible móvil está compuesto por un aparato de base móvil sobre ruedas 7 para la colocación de libre elección. A este aparato de base está fijado, a través de un brazo de apoyo 8, un cabezal de medición 4 que se puede mover libremente en el espacio. Adicionalmente están colocados para la conducción de haz óptico de la radiación láser necesaria para el barrido con láser con formación de imágenes dos ópticas de transmisión óptica 3 diferentes, un brazo articulado de espejo 31 y una fibra óptica 32, entre el aparato de base 7 y el cabezal de medición 4. Estos están previstos para la transmisión de la radiación de excitación para diferentes procedimientos de detección, por ejemplo, sin pérdida de la generalidad, para tomografía multifotónica y CARS, superponiéndose de forma colineal los diferentes haces de excitación en el cabezal de medición 4. Para esto, en el cabezal de medición 4 se emplea el sistema mostrado en principio en la Fig. 1 de la estabilización de haz con fotodetector 5 sensible a posición, unidad de control 6 y espejo orientable controlable 2. Por ello es posible la alineación libre mostrada en la Fig. 3 del cabezal de medición 4 a una sección situada de forma discrecional en espacio de piel 91 humana como objeto de medición 9 (ser humano), sin que se produzca cambio alguno (empeoramiento) de las condiciones de excitación como consecuencia de las diversas posibilidades de pivotado del cabezal de medición 4.

Otras configuraciones técnicas distintas del microscopio de barrido de acuerdo con la invención inclusive algunas de las diversas posibilidades de aplicación se explican con detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo de realización 2

El microscopio de acuerdo con la invención de la Fig. 4, tal como se ha descrito anteriormente en la Fig. 3, está compuesto por un aparato de base móvil sobre ruedas 7 para la colocación de libre elección.

Para la formación de imágenes multifotónica existe en el aparato de base 7 un sistema del láser de impulso corto 71 (5 fs-500 ps; con perfil de haz gaussiano, por ejemplo un láser de titanio : zafiro) así como una unidad óptica 72 en la que el espejo orientable controlable 2 como espejo orientable de dos ejes 21 acopla el haz láserico 11 procedente del sistema de láser de impulso corto 71 en una óptica de transmisión 3 flexible en forma de un brazo articulado de espejo 31. En este primer ejemplo, el haz láserico 11 se conduce a través del brazo articulado de espejo 31 flexible al cabezal de medición 4 óptico. Un brazo de apoyo 8 de varios miembros móvil y que se puede bloquear en cualquier posición posibilita la libre colocación del cabezal de medición 4 óptico, de tal manera que se arrastra de forma obligada correspondientemente el brazo articulado de espejo 31. Por tanto, el cabezal de medición 4 se puede colocar con su óptica de enfoque 44 en una alineación discrecional sobre el objeto de medición 9, en el caso de una posición de 90° a un objeto de medición 9 con superficie vertical, en este ejemplo un cuadro 92 colgado cuya composición (material o estructura de capas) se debe examinar. A este respecto, a causa del control constante y el reajuste de la dirección de eje de haz láserico 11, el plano diana 41 está iluminado siempre de forma constante, de tal manera que se evitan errores de medición que resultan de una radiación de excitación variable.

La segunda fuente de radiación requerida para la formación de imágenes por CARS (adicionalmente a la formación de imágenes por MPT) con una longitud de onda que difiere del láser de impulso corto 71 se genera a partir del láser de impulso corto 71 al desacoplarse a través de un divisor de haz 725 una parte de radiación de aproximadamente la mitad del haz láserico 11 y suministrándose como haz láserico 11' a un desplazador de frecuencia 73. El haz láserico 12 emitido a partir de esto con longitud de onda divergente se acopla asimismo en la unidad óptica 72, conduciéndose el haz láserico 12 a través de un segundo espejo orientable de dos ejes 22 controlable (con la misma función que el espejo orientable de dos ejes 21) adicionalmente por un sistema de telescopio 722 con separación de lente variable y un tramo de retraso óptico variable 723 y después de atravesar una disposición de espejos 724 ajustable y un espejo dicróico 726 está alineado con el haz láserico 11 del láser de impulso corto 71 de forma colineal (superposición espacial de las dos partes del haz a lo largo del mismo eje). Los dos haces lásericos 11 y 12 se acoplan detrás del espejo dicróico 726 de forma colineal en el brazo articulado de espejo 31 y se transmiten al cabezal de medición 4. La coincidencia de ejes de los dos haces lásericos 11 y 12 se supervisa entonces permanentemente en el cabezal de medición 4 al comprobarse la iluminación media del fotodiodo 51 sensible a posición en el haz de ensayo 43 desacoplado de la trayectoria de haz a la óptica de enfoque 44 a través del divisor de haz 43 y al corregirse mediante la unidad de control 6 la divergencia constatada a través de los espejos orientables de dos ejes 21 y 22 controlables de la unidad óptica 72 para cada uno de los haces lásericos 11 y 12. Por ello, con cada alineación discrecional del brazo articulado de espejo 31 se garantiza que esté iluminada homogéneamente la pupila de entrada de la óptica de enfoque 44 (plano diana 41). En lugar de la pupila de entrada de la óptica de enfoque 44 se puede usar también una limitación de apertura de otro elemento óptico usado en el cabezal de medición 4.

La superposición temporal de los impulsos de láser individuales de los dos haces lásericos 11 y 12 se realiza mediante graduación manual o a motor del tramo de retraso óptico variable 723. Las posiciones de foco separadas una de otra detrás de la óptica de enfoque 44 por dispersión de los haces lásericos 11 y 12 diferentes en la longitud

de onda se pueden superponer por el sistema de telescopio 722 dentro del objeto de medición 9 (en el presente ejemplo, de un cuadro 92).

5 Dentro del cabezal de medición 4 se conduce la parte principal de la radiación láser de los dos haces lásericos 11 y 12 a través del divisor de haz 42 a una unidad de barrido 46 prevista para un barrido bidimensional. Detrás de la unidad de barrido 46, la radiación láser se conduce a través de un sistema de telescopio 47 a la pupila de entrada de la óptica de enfoque 44 y se enfoca con la óptica de enfoque 44 en el cuadro 92 que se va a examinar.

10 La unidad de barrido 46 permite una desviación bidimensional de los haces lásericos 11 y 12 dentro del plano focal de la óptica de enfoque 44, de tal manera que se puede realizar un barrido o excitación bidimensional en forma de retícula del cuadro 92.

15 La representación tridimensional tomográfica del objeto de medición 9 (como toma apilada a través de distintas capas del cuadro 92) se posibilita por la graduación sistemática de la óptica de enfoque 44 a través de un posicionador de eje Z 48.

20 Las señales generadas en el plano focal de la óptica de enfoque 44 en el cuadro 92 en cada caso de los diferentes haces de excitación (haces lásericos 11 y 12 con distinta longitud de onda y secuencia de impulsos) se reciben de forma integradora por la óptica de enfoque 44 del cabezal de medición 4 y se separan mediante dos divisores de haz dicróicos 451 y 452 para el desacoplamiento de las señales de medición, por ejemplo, señales de autofluorescencia y SHG, de la radiación de excitación reflejada y se conducen a dos detectores de medición, detector MP 54 y detector CARS 55. La evaluación de las señales MP y CARS se realiza en el aparato de base 7 en una unidad de evaluación 61 y se puede representar en una unidad de visualización 62 como distribución del valor de gris multidimensional como una imagen.

25 Para una toma de imagen basada en recuento de fotón individual con correlación temporal (inglés *Time Correlated Single Photon Counting* – TCSPC) con el fin de especificar átomos y moléculas y su entorno mediante medición de los tiempos de decaimiento de las vibraciones atómicas y moleculares, los detectores de medición 54 y 55 se pueden sustituir por detectores de alta resolución temporal y se pueden procesar sus señales en la unidad de evaluación 61. Para el disparo requerido en mediciones de TCSPC está previsto un diodo de disparo 56 que aprovecha un reflejo de lado posterior parasitario de uno de los divisores de haz 451 o 452. En este ejemplo se usa el reflejo de lado posterior del divisor de haz 451.

35 Opcionalmente se puede aprovechar también para el fotodiodo 51 sensible a posición, con cuya señal de salida la unidad de control 6 a través de los espejos orientables de dos ejes 21 y 22 controla la posición estable de los haces lásericos 11 y 12 con respecto al plano diana 41 definido en el cabezal de medición 4, un reflejo de lado posterior parasitario de uno de los divisores de haz 451 o 452. Para esto, en la Fig. 4 esta posición alternativa con respecto al fotodiodo 51 está dibujada con líneas discontinuas y se denomina fotodiodo 51', aprovechándose el reflejo de lado posterior parasitario del divisor de haz 452. Este fotodiodo 51' alternativo, ya que se encuentra más próximo al plano diana 41 (pupila de entrada de la óptica de enfoque 44), se puede preferir y entonces sobra el fotodiodo 51 dispuesto en el haz de ensayo 43. El divisor de haz 42 en este caso se puede sustituir por un espejo completo (no dibujado).

45 Con esta excitación con estabilización de haz láserico del cuadro 92 que se va a medir se mejora la estabilidad de dirección en un factor 10-20. Una mejora de este tipo asegura una iluminación homogénea del campo de la imagen en todas las posiciones del cabezal de medición 4 y, por consiguiente, resultados de medición comparables reproducibles.

50 Ejemplo de realización 3

La Fig. 5 muestra el sistema de medición mediante el uso de un brazo articulado de espejo 31 y una fibra óptica 32 como dos sistemas de transmisión 3 ópticos de conducción de haz independientes.

55 El láser de pulso corto 71 se acopla del mismo modo, tal como en el segundo ejemplo, con la unidad óptica 72 a través del espejo orientable de dos ejes 21 en el brazo articulado de espejo 31 flexible y se conduce al cabezal de medición 4 óptico.

60 Los desplazadores de frecuencia 73 usados para la generación de la formación de imágenes por CARS adicional se alimentan mediante el haz láserico 11' desacoplado del divisor de haz 725 a través de un espejo de desviación 721 con la longitud de onda de salida generada por el láser de pulso corto 71 y envía un haz láserico 12 con longitud de onda diferente del láser de pulso corto 71. Entonces, a diferencia del anterior ejemplo, el haz láserico 12, después de que haya atravesado en primer lugar el sistema de telescopio 722, se alinea mediante un primer espejo orientable de un eje 23 y un segundo espejo orientable de un eje 24, dispuesto en ortogonal con respecto a esto, delante del tramo de retraso óptico 723 en dos direcciones de coordenadas por separado. Por lo demás, tal como se describe en la Fig. 4, atraviesa el tramo de retraso 723 y la disposición de espejos 724. Después, el haz láserico 12, asimismo de forma diferente a la estructura de la Fig. 4, no atraviesa ningún divisor de haz dicróico 726 para el

agrupamiento con el haz láserico 11, sino que se acopla por separado en una fibra guíaonda 32 y se conduce a través de la misma al cabezal de medición 4.

5 En el cabezal de medición 4, el haz láserico 12 a través de un divisor dicróico 421 adecuado, que asume al mismo tiempo para el haz láserico 11 la función de desviación así como la función de divisor para el desacoplamiento del haz de ensayo 43 al fotodiodo 51, se superpone de forma colineal con el haz láserico 11 suministrado al brazo articulado de espejo 31 y se enfoca al tejido de un ratón 93 (como objeto de medición 9 concreto).

10 La detección y el procesamiento adicionales de las señales que retornan del tejido de un ratón 93 se realizan en este ejemplo de forma desacoplada a través del divisor de haz 421 mediante un detector 57 común para las señales MP y CARS generadas, pudiendo discriminarse por el bloqueo de uno de los haces lásericos 11 o 12 o, como alternativa, mediante cambio de la posición de fase (relación temporal) de los dos haces lásericos 11 y 12 entre sí mediante el grupo de retraso 723 las señales CARS de las señales MP, por lo que el detector 57 recibe solo señales MP. Además, mediante excitación con corrección de fase de los dos haces lásericos 11 y 12 se pueden detectar las
15 señales CARS y MP del tejido de ratón 93 juntas (superpuestas).

Ejemplo de realización 4

20 En la Fig. 6 se representa otra configuración ventajosa del microscopio láser de barrido, usándose dos fibras ópticas 32 y 33 como sistemas de transmisión 3 ópticos de conducción de haz.

25 Los dos haces lásericos 11 y 12 con diferente longitud de onda se conducen en la unidad óptica 72 como en el tercer ejemplo, se alinean y se ajustan entre sí sin superponerse uno con otro. Sin embargo, el haz láserico 12 a diferencia de los anteriores ejemplos se genera en una segunda fuente de láser 74 y se acopla después de una sincronización de fases ligeramente más compleja en el grupo de retraso 723 y la posterior disposición de espejos 724 en la fibra guíaondas 32 (como en el tercer ejemplo de acuerdo con la Fig. 5). En este caso, el haz láserico 11 se acopla en la segunda fibra, preferentemente una fibra monomodal 33. Las dos fibras 32 y 33 se superponen entonces de forma colineal en el cabezal de medición 4, de forma análoga al tercer ejemplo, mediante un divisor dicróico 421. La alineación colineal estabilizada de los haces lásericos 11 y 12 así como la detección de las señales
30 excitadas con ello suceden del mismo modo como se describe en el segundo ejemplo de realización.

35 Como objeto de medición 9 pueda estar fijada una placa de Petri 94 llena con sustancias líquidas o sólidas de forma rígida en el cabezal de medición 4 (en el caso más sencillo por ejemplo con cinta adhesiva de doble cara) o se puede acoplar de forma móvil con una mesa de posicionamiento (por ejemplo, mesa en cruz de dos o tres ejes, no mostrada). Esto posibilita una formación de imágenes microscópica con una complejidad técnica muy reducida. En lugar de una placa de Petri 94 se pueden examinar también placas de microtitulación del mismo modo con respecto a sus sustancias. La disposición de microscopio invertido mostrada de forma estilizada en la Fig. 6 permite por tanto examinar muestras discrecionales, tales como por ejemplo muestras incluidas en soluciones nutritivas, sustancias
40 sólidas pulverizadas o granuladas o incluso cuerpos sólidos (zonas próximas a la superficie).

45 Las ventajas del sistema MPT descrito con detección CARS radican, con respecto a sistemas convencionales e inflexibles, en el cabezal de medición 4 que se puede colocar libremente en el espacio por el brazo articulado óptico 31 y/o fibras guíaondas 32, 33, con peso reducido y el aparato de base móvil 7. Una disposición de este tipo permite al usuario poder realizar de forma reproducible en un tiempo corto mediciones combinadas de alta resolución (ahorro de tiempo y costes) y disponer, a este respecto, de una disposición de medición microscópica que puede llevar a cabo para superficies de objeto de alineación discrecional de forma completamente equivalente (compatible) y sin movimiento de objeto de medición (por ejemplo, traslados de pacientes) o toma de muestras del objeto de medición 9 una pluralidad de mediciones en partes distintas del objeto de medición 9 (en particular del cuerpo humano o animal).
50

Además, la colocación flexible del cabezal de medición 4 permite una denominada formación de imágenes inversa, tal como se emplea con preferencia en la microscopía convencional.

55 A diferencia de los sistemas de microscopio convencionales, que están disponibles solo como microscopio vertical (0°) o como microscopio invertido (180°), la presente invención con el cabezal de medición 4 de movilidad ilimitada permite también la disposición en posición 90° y una desviación discrecional de esto. Por ello son posibles también mediciones en objetos en vertical, tales como por ejemplo exámenes de cultivos de mohos en paredes, de partes vegetales dentro de una plantación, análisis de material (véase la Fig. 4), exámenes en animales (véase la Fig. 5) y exámenes de piel en el ser humano (Fig. 3) así como exámenes criminalísticos del tipo más diverso, al igual que el aprovechamiento como microscopio láser de barrido inverso para el examen de sustancias líquidas o sólidas discrecionales (Fig. 6).
60

65 Con una pieza añadida (no dibujada) adaptada correspondientemente en el cabezal de medición 4 además es posible usar una mesa de posicionamiento (mesa en cruz) en el cabezal de medición 4 para ofrecer un rendimiento convencional de microscopio que, a causa de la movilidad del microscopio de barrido (aparato de base 7), permite en cualquier lugar discrecional exámenes de alta resolución sobre zonas de muestra macroscópicas.

5 Las ventajas del acoplamiento de sistemas de diagnóstico de formación de imágenes de la microscopía CARS, microscopía SHG y/o microscopía de fluorescencia multifotónica con respecto a sistemas de diagnóstico independientes en cada caso radican en la combinación de los procedimientos de la excitación y formación de imágenes por CARS, SHG y multifotónica en un aparato de base móvil 7 compacto con cabezal de medición 4 flexible. La disposición propuesta con brazo articulado 31 flexible o fibra óptica 32, 33 permite una colocación libre de un cabezal de medición 4 sin limitaciones de la resolución y sin falseamientos de la señal como consecuencia del ajuste erróneo de la radiación de excitación, al registrarse la última de forma fiable de manera sencilla y robusta y corrigiéndose y quedando garantizada por tanto una formación de imágenes y evaluación con minimización de errores.

10

Lista de referencias

- 1 láser
- 11 haz láserico (haz de excitación)
- 12 haz láserico (segundo haz de excitación)
- 13 perfil de haz

- 2 espejo orientable (controlable)
- 21, 22 espejo orientable de dos ejes
- 23, 24 espejo orientable de un eje

- 3 óptica de transmisión
- 31 óptica articulada de espejo
- 32 fibra guiaondas
- 33 fibra monomodal

- 4 cabezal de medición
- 41 posición diana
- 42 divisor de haz
- 421 divisor dicroico
- 43 haz de ensayo
- 44 óptica de enfoque
- 45 divisor de desacoplamiento de señal
- 451 divisor de haz dicroico
- 452 divisor de haz dicroico
- 46 unidad de barrido
- 47 sistema de telescopio
- 48 posicionamiento de eje Z

- 5 fotodetector (sensible a posición)
- 51 fotodiodo (circular)
- 52, 53 componente de señal (en dirección X, Y)
- 521, 531 máximo
- 54 detector (MP)
- 55 detector (CARS)
- 56 diodo de disparo
- 57 detector común

- 6 unidad de control
- 61 unidad de evaluación
- 62 unidad de visualización

- 7 aparato de base (móvil)
- 71 láser de impulso corto
- 72 unidad óptica
- 721 espejo de desviación
- 722 sistema telescópico
- 723 grupo de retraso
- 724 disposición de espejos
- 725 divisor de haz
- 726 espejo dicroico
- 73 desplazador de frecuencia
- 74 segunda fuente de láser

- 8 brazo de apoyo

ES 2 712 799 T3

9	objeto de medición
91	piel humana
92	pintura
93	tejido de un ratón
94	placa de Petri (con sustancia líquida)

REIVINDICACIONES

1. Microscopio láser de barrido no lineal flexible para la detección tridimensional no invasiva, que contiene al menos una fuente de radiación que genera al menos un haz de excitación de radiación láser pulsada para la activación de una radiación secundaria emitida por átomos y moléculas, una óptica de transmisión flexible para la transmisión de la radiación a un cabezal de medición con una óptica de enfoque con la que se enfoca la radiación en un objeto de medición y se devuelve la radiación secundaria emitida y se dirige a al menos un sistema de detector, estando unido el cabezal de medición (4), de forma que se puede pivotar y girar libremente en el espacio y colocar de forma flexible, a la al menos una fuente de radiación (1; 71; 74), de tal manera que se puede realizar microscopía vertical, invertida así como microscopía en ángulos discrecionales del espacio, **caracterizado por que**
- hay dispuesto al menos un espejo orientable (2), controlable para la desviación y alineación del al menos un haz de excitación (11; 12) de radiación láser pulsada de la al menos una fuente de radiación, de tal manera que se dirige el al menos un haz de excitación (11; 12) a través de la óptica de transmisión (13) al cabezal de medición (4) de modo que el al menos un haz de excitación (11; 12) está dispuesto en cualquier posición del cabezal de medición (4) de forma concéntrica con respecto a un elemento óptico de apertura limitada del cabezal de medición (44),
 - hay dispuesto un divisor de haz (42) para el desacoplamiento de una parte pequeña del al menos un haz de excitación (11; 12) en el cabezal de medición (4) delante de la óptica de enfoque (44) para generar un haz de ensayo (43),
 - hay dispuesto un fotodiodo (5) en un plano conjugado con el plano diana (41) en el haz de ensayo (43), correspondiéndose una alineación media del haz de ensayo (43) en el fotodiodo (5) con la alineación normal del haz de excitación (11, 12) en el plano diana y
 - mediante desviación del haz de excitación en direcciones X e Y sucesivamente se generan en cada caso componentes de señal X e Y (52, 53) dependientes de la posición, correspondiéndose el respectivo máximo (521, 531) de las componentes de señal X e Y dependientes de la posición con la alineación media del haz de ensayo (43) en el fotodiodo (5) y
 - está presente una unidad de control (6) para el control del espejo orientable controlable (2) que, con ayuda de las componentes de señal X e Y dependientes de la posición, alinea el espejo orientable controlable de tal manera que el haz de ensayo es dirigido de forma central sobre el fotodiodo, de tal manera que se consigue una estabilización de dirección del al menos un haz de excitación independientemente de la magnitud de la alteración debida a la posición de la óptica de transmisión (3).
2. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el al menos un espejo orientable controlable (2) es accionado mediante al menos un soporte de espejo controlable sobre la base de un principio de accionamiento del grupo de reguladores capacitivos, inductivos o piezoeléctricos, motores paso a paso o motores de corriente continua.
3. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el al menos un espejo orientable controlable (2) está realizado mediante un soporte de espejo de dos ejes (21; 22) o dos soportes de espejo de un eje (23; 23).
4. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** como plano diana (41) del al menos un haz de excitación (11; 12) está seleccionada la pupila de entrada de la óptica de enfoque (44) o de otro elemento óptico de apertura limitada.
5. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** para la generación del haz de ensayo (43) en función de la conducción del haz del al menos un haz de excitación (11; 12) en el cabezal de medición (4), el divisor de haz (42) está configurado como divisor de haz de reflexión o de transmisión.
6. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el divisor de haz (42) está configurado para el desacoplamiento del haz de ensayo (43) al mismo tiempo como espejo dicróico para el acoplamiento colineal de dos haces de excitación (11; 12) diferentes.
7. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el fotodiodo (5) es un fotodiodo circular (51).
8. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** adicionalmente a la regulación de la estabilidad del haz en la óptica de transmisión (3) se puede determinar y corregir la estabilidad de puntería del láser.
9. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el sistema de detector para la radiación secundaria está configurado con un detector (54) para la formación de imágenes por MPT o SHG, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes que permite, a través de un brazo articulado óptico flexible (31) de escasa precisión mecánica, una colocación a libre discreción del cabezal de medición (4) en el espacio y garantiza una formación de imágenes por MPT reproducible.

- 5 10. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** están acoplados dos haces lásericos (11, 12) de diferente longitud de onda en un brazo articulado óptico flexible (31) y el sistema de detector para las radiaciones secundarias está equipado con detectores (54; 55) para la formación de imágenes por MPT y para la formación de imágenes por CARS, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes y no fluorescentes en materia animada que permite a través de un brazo articulado óptico flexible (31) común una colocación a libre discreción en el espacio del cabezal de medición (4) usado en común y genera una formación de imágenes simultánea y en el mismo lugar a partir de señales MPT y CARS.
- 10 11. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** están acoplados dos haces lásericos (11, 12) de diferente longitud de onda en un brazo articulado óptico flexible (31) y una fibra óptica (32) independiente y el sistema de detector está equipado con un detector (57) común para las radiaciones secundarias para la formación de imágenes por MPT y para la formación de imágenes por CARS, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes y no fluorescentes en materia animada que permite a través de un brazo articulado óptico flexible (31) y una fibra óptica (32) independiente una colocación a libre discreción en el espacio del cabezal de medición (4) usado en común y genera una formación de imágenes simultánea y en el mismo lugar a partir de señales MPT y CARS.
- 15 12. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** están acoplados dos haces lásericos (11, 12) de diferente longitud de onda en dos fibras ópticas (32; 33) independientes y el sistema de detector para las radiaciones secundarias está equipado con detectores (54; 55) para la formación de imágenes por MPT y para la formación de imágenes por CARS, de tal manera que existe un sistema de diagnóstico flexible para sustancias fluorescentes y no fluorescentes en materia animada que permite a través de dos fibras ópticas (32; 33) independientes una colocación a libre discreción en el espacio del cabezal de medición (4) usado en común y genera una formación de imágenes simultánea y en el mismo lugar a partir de señales MPT y CARS.
- 20 25 13. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el sistema de detector para la radiación secundaria presenta un detector de medición (57) común para la formación de imágenes por MPT y para la formación de imágenes por CARS, estando previstos medios para la interrupción temporal de la excitación CARS que permiten una separación de la formación de imágenes por MPT con respecto a una representación de señal combinada.
- 30 35 14. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el sistema de detector para la radiación secundaria presenta detectores TCSPC para la formación de imágenes por MPT y adicionalmente un diodo de disparo (56) que aprovecha un reflejo del lado posterior de un divisor de haz (451) previsto para el desacoplamiento de la señal de medición.
- 40 45 15. Microscopio láser de barrido de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el cabezal de medición (4) está apoyado mecánicamente mediante un brazo de apoyo óptico flexible (31), que se puede bloquear en posiciones discretas, en un aparato de base móvil (7) y se arrastra de forma obligada la óptica de transmisión (3), estando presentes en el aparato de base (7) al menos una fuente de radiación (71) para la generación de radiación de excitación (11; 12) pulsada, una unidad óptica (72) para la sincronización de la radiación de excitación (11; 12) pulsada y alineación con al menos una óptica de transmisión (31; 32; 33) al cabezal de medición (4) así como la unidad de control (61) para la estabilización de la dirección de la radiación de excitación (11; 12) en el cabezal de medición (4) y una unidad de evaluación (6) para el procesamiento de las señales transmitidas por el sistema de detector (54, 55) del cabezal de medición (4) para la representación con formación de imágenes con una unidad de visualización (62).

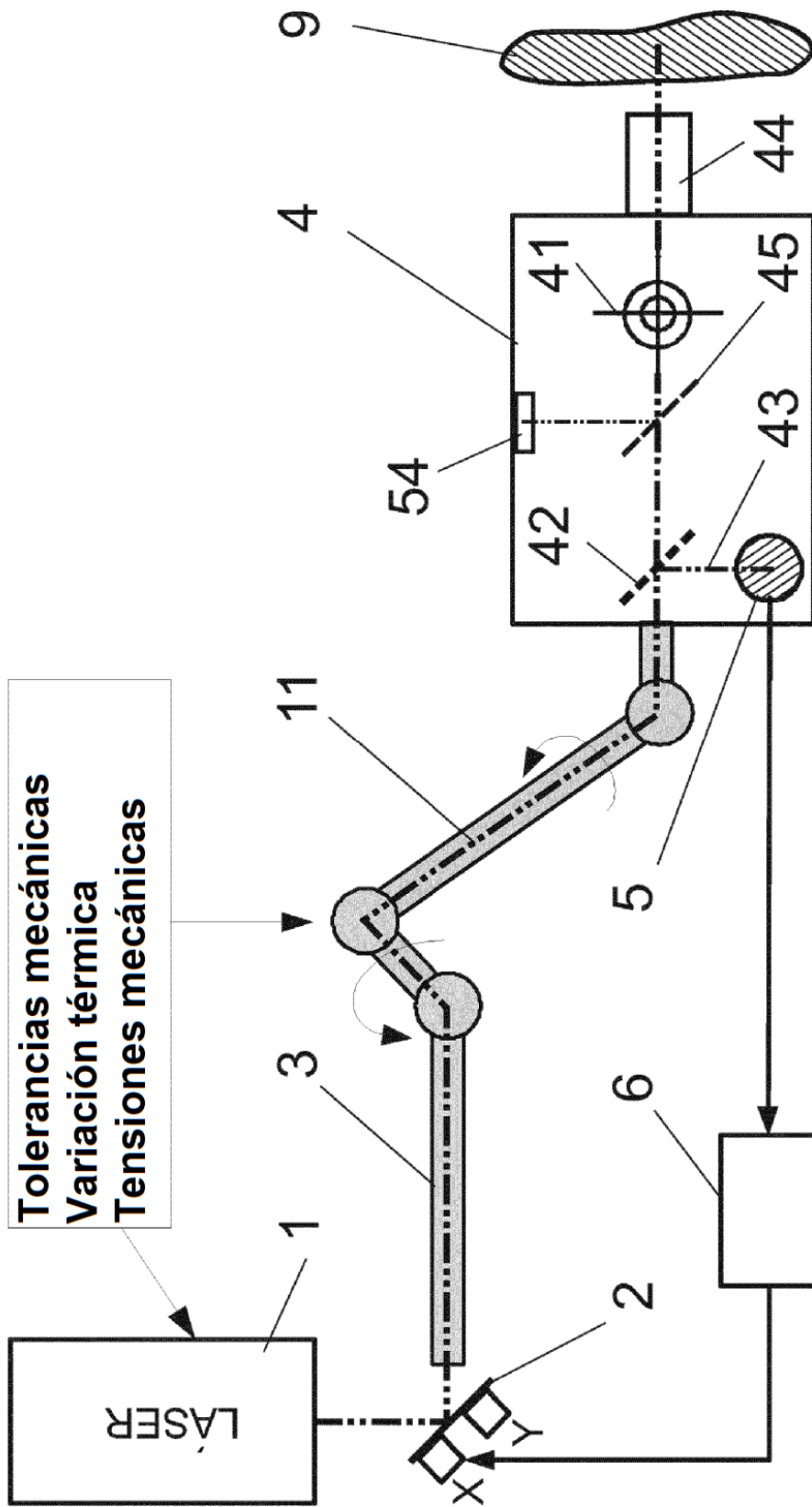


Fig. 1

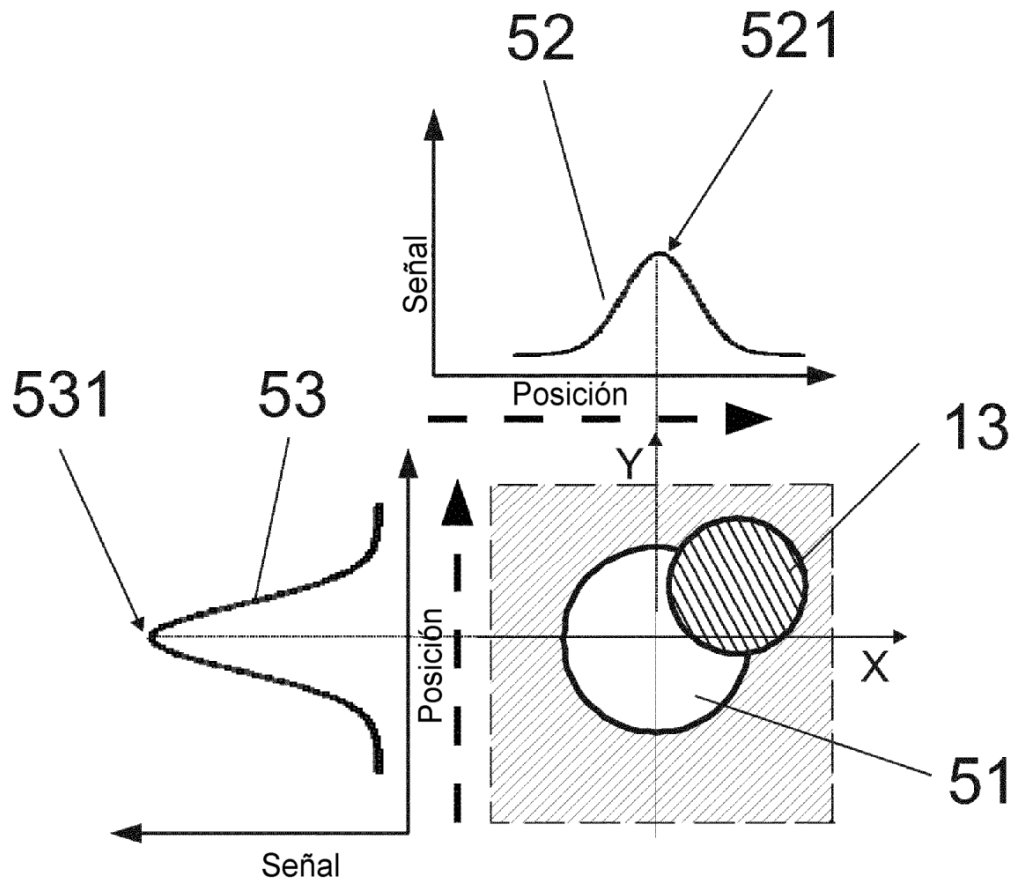


Fig. 2

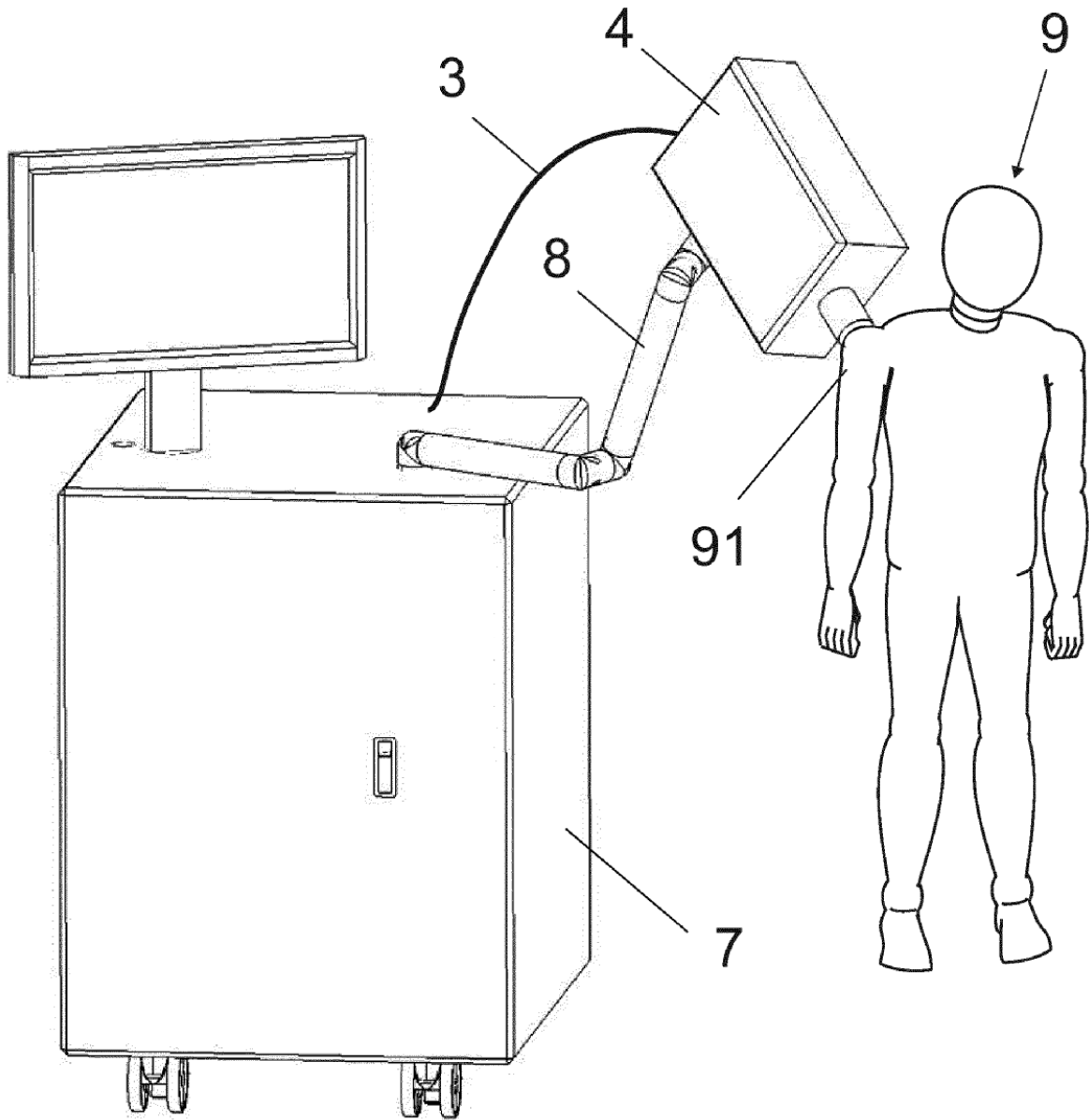


Fig. 3

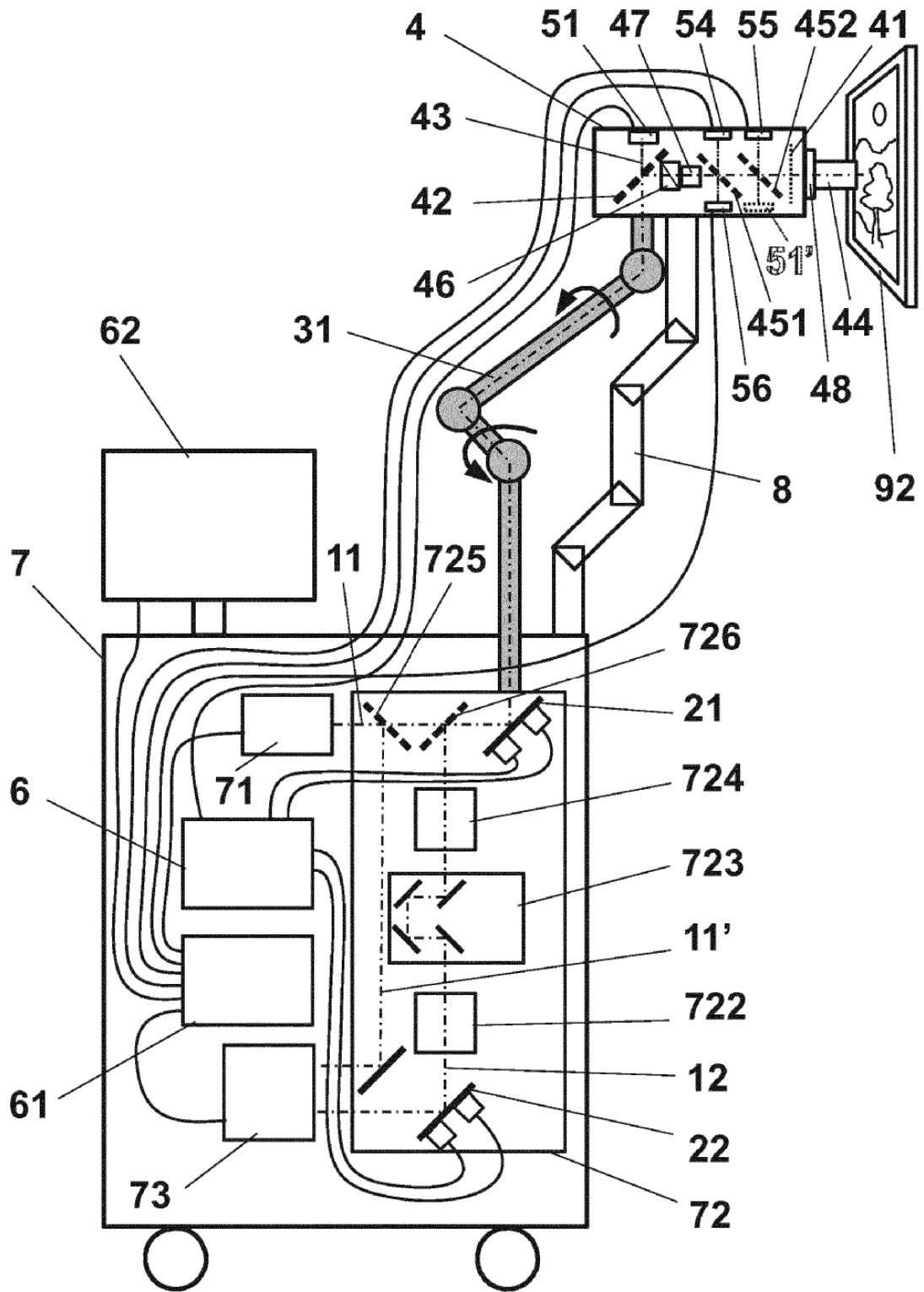


Fig. 4

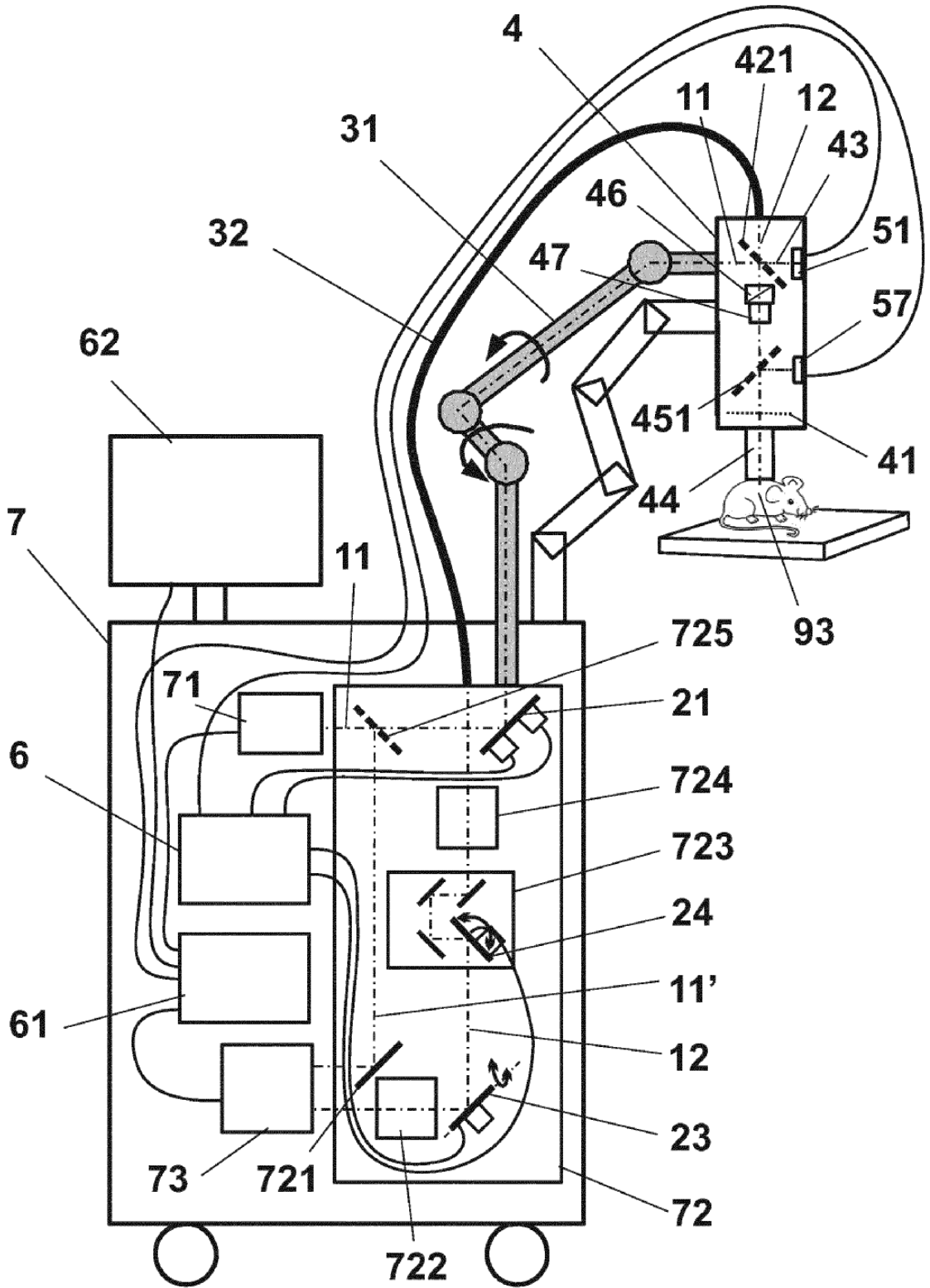


Fig. 5

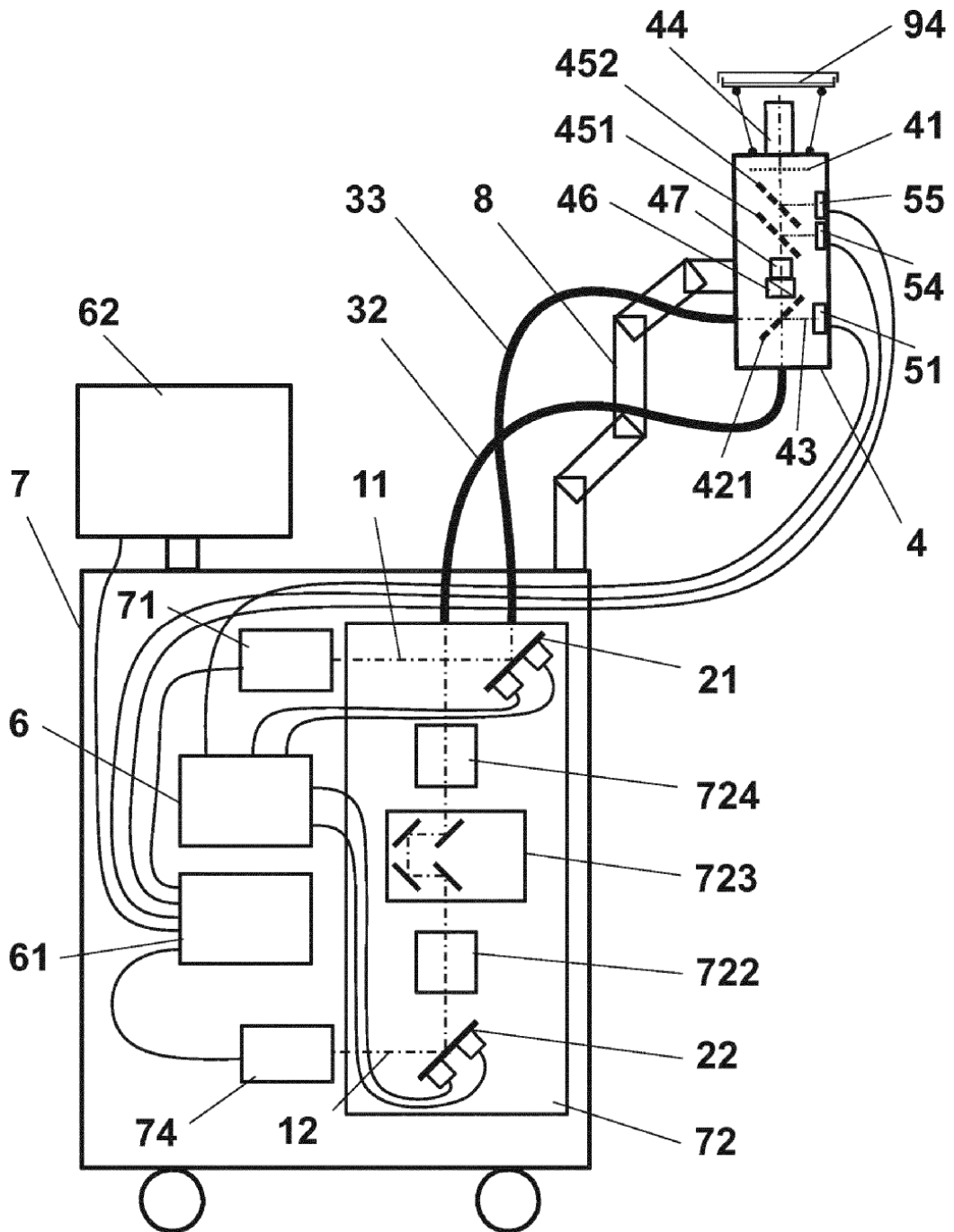


Fig. 6