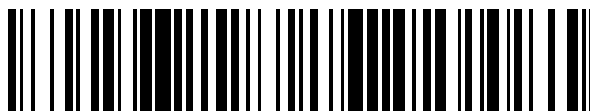


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 075**

51 Int. Cl.:

G01N 21/47 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011 PCT/EP2011/073077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12080478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11807668 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2652482**

54 Título: **Técnica para la detección de imágenes tomográfica**

30 Prioridad:

17.12.2010 DE 102010063412

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

19.06.2020

73 Titular/es:

**LASER ZENTRUM HANNOVER E.V. (100.0%)
Hollerithallee 8
30419 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**LORBEER, RAOUL-AMADEUS;
MEYER, HEIKO;
HEIDRICH, MARKO y
HEISTERKAMP, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 768 075 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

Técnica para la detección de imágenes tomográfica

Ámbito técnico

5 La invención se refiere, en general, a una técnica para la detección de una imagen seccional o de una imagen tridimensional. En particular, la invención se refiere a un dispositivo para la detección de imágenes tomográfica de un objeto espacial.

Trasfondo técnico

10 Resolución y contraste de técnicas existentes para la detección de imágenes espacial, en particular, para la microscopia de organismos vivos, se han mejorado recientemente de manera considerable. Técnicas frecuentes con alta resolución, como la microscopia confocal descrita en el documento DE 43 26 473, se basan en la detección con resolución local de una superposición de volumen de iluminación y volumen de detección. El volumen de la superposición determina la resolución. Procedimientos alternativos, como la microscopia de coherencia óptica ("Optical Coherence Microscopy", OCM) y la tomografía de coherencia óptica ("Optical Coherence Tomography", OCT), determinan interferométricamente, por medio de luz con longitud de coherencia, la profundidad axial.

15 Técnicas más recientes, como la tomografía de proyección óptica ("Optical Projection Tomography", OPT), descrita en Science 296, 541 (2002) por J. Sharpe et al., radian el volumen de muestra bajo una pluralidad de diferentes ángulos y logran una resolución dependiente de 1 a 5 µm.

20 El documento WO 2004/020997 A1, describe un dispositivo con una platina portaespecimen giratoria, para el giro de la muestra a ser proyectada. Un detector principal detecta solo luz, que sale de la muestra paralela con respecto a la dirección de incidencia de luz. En otras formas de realización, un detector principal y una pluralidad de detectores de ayuda están dispuestos detrás de la muestra en una matriz de una o de dos dimensiones en dirección del haz, para la detección de luz con resolución angular, detectándose por los detectores de ayuda luz desviada por la muestra.

25 El documento US 2008/0277567 A1, describe un dispositivo para la detección reticular de una propiedad óptica de una muestra. Por medio de dos espejos planos giratorios y dos espejos parabólicos se dirige un rayo láser sobre la muestra, siempre paralelo con respecto al eje óptico. Una proyección bidimensional se obtiene, respectivamente, en un proceso de escaneo. Las proyecciones de bidimensionales de varios procesos de escaneo se componen a una imagen tridimensional mediante cromatografía computarizada.

30 El documento US 2007/0109633 A1, describe un microscopio, que transilumina un plano en el volumen de muestra con un conjunto de haces de luz paralelos. El plano de iluminación así formado se detecta con resolución local por una cámara de CCD bajo un ángulo recto con respecto al plano de iluminación en sus dos dimensiones. En otra forma de realización, se radian dos planos de iluminación. Mediante superposición de dos planos de iluminación coherentes, la distribución de intensidad en el plano de iluminación superpuesto se estructura mediante patrones de interferencia para la mejora de la resolución local en el plano de iluminación. Para la detección de imágenes espacial, el plano de iluminación y la muestra se mueven entre ellos. Otra forma de realización ilumina la muestra

35 esencialmente en una dimensión y detecta la muestra en esa dimensión con resolución local con una cantidad lineal aumentada de puntos de imagen.

El documento US 2007/0274580 A1, describe una técnica para la tomografía óptica. Proteínas fluorescentes en una muestra se excitan mediante luz radiada. La luz de excitación en la muestra y la luz fluorescente son difusas. Se detecta y se procesa una imagen con resolución local.

40 La publicación científica "Forward and Inverse Calculations for 3-D Frequency-Domain Diffuse Optical Tomography" de B. W. Pogue et al., SPIE vol. 2389, páginas 328-339, describe un procedimiento de la tomografía óptica difusiva (DOT). Para una simulación del procedimiento, se asume que una pluralidad de detectores está dispuesta en un círculo alrededor de un objeto.

45 Las técnicas conocidas para la detección de imágenes espacial pueden, a causa de una intensidad de radiación que influye sobre la muestra, falsear la detección de imágenes, modificar la muestra de forma incontrolada o, en particular, en caso de microscopia en vivo, destruir la muestra. También puede aumentar considerablemente el costo técnico, para reducir con las técnicas existentes la intensidad de radiación con resultados de imagen comparables.

Sumario de la invención

50 La invención tiene la misión subyacente de proporcionar un dispositivo mejorado para la detección de imágenes tomográfica.

La misión se resuelve mediante un dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con las características de la reivindicación 1.

El dispositivo de acuerdo con la invención para la detección de imágenes tomográfica comprende:

- un soporte de muestras,

- una fuente de luz, que está configurada para la generación de un haz en forma de aguja que atraviesa el soporte de muestras con una dirección del haz, y que presenta un elemento de regulación óptico, que es capaz de desplazar el haz en forma de aguja, que atraviesa el soporte de muestras, transversal con respecto a la dirección del haz con dirección del haz esencialmente inalterada, y

- una unidad de detector, que está configurada para la detección sin resolución local de al menos una proporción de una radiación dispersa que se escapa del soporte de muestras dentro de una sección del haz en forma de aguja.

El soporte de muestras prevé un volumen de muestra para la aceptación de una muestra. El haz en forma de aguja puede atravesar el soporte de muestras, el volumen de muestra y/o la muestra.

El dispositivo puede detectar, a causa de un haz en forma de aguja individual, la radiación dispersa que se escapa (transversal con respecto a la dirección del haz). En comparación con las técnicas convencionales, de esta manera, mediante la unidad de detector, es detectable una proporción considerablemente mayor de la radiación dispersa. Por consiguiente, se puede mejorar significativamente la relación de señal a ruido de la detección. También, se puede reducir una intensidad de radiación (con calidad de imagen igual o mejorada) introducida mediante el haz en forma de aguja. Además, se puede descartar una mezcla de señales de haces en forma de aguja (es decir, diferentes posiciones de medición) desplazados (paralelos) entre ellos. También se puede detectar el volumen de muestra con una sensibilidad uniforme, siempre que la misma unidad de detector detecte todas las posiciones de medición. En particular, se pueden evitar artefactos anulares (como se producen a menudo en la reconstrucción tomográfica de una detección con resolución local). En comparación con las técnicas convencionales de detección con resolución local, la detección mediante la unidad de detector puede considerarse como "cero dimensional". Además, se puede lograr una iluminación más homogénea (en efecto) del volumen de muestra, en particular, transversal con respecto a la dirección del haz, en comparación con una iluminación (que, por ejemplo, utiliza un difusor) simultánea. De manera ventajosa, la fuente de luz comprende un láser estable como fuente de radiación, para una excitación lo más homogénea posible de la radiación dispersa (a través de un tiempo de detección de imagen).

En general, la fuente de radiación puede ser, esencialmente, coherente espacialmente, en particular, puntiforme. Una fuente de radiación preferida es un láser. Por ejemplo, la fuente de radiación puede ser una fuente de luz fluorescente, preferiblemente, un diodo superluminiscente (SLD) con abertura de salida pequeña. Un diámetro de la abertura de salida puede estar determinado tan pequeño, que la abertura de salida es al menos, esencialmente, de difracción limitada. Preferiblemente, el diámetro de la abertura de salida corresponde (como mucho) al doble del límite de difracción.

"Radiación dispersa" comprende cualquier radiación producida mediante efecto recíproco (electromagnético, de física cuántica o térmico) del haz en forma de aguja con una muestra (en particular, con sus pigmentos, centros de difusión, moléculas o átomos) aceptada en el soporte de muestras. En particular, la radiación dispersa comprende radiación producida mediante fluorescencia, dispersión Raman, dispersión Rayleigh y difusión de Mie. Además, la radiación dispersa puede estar determinada por una dirección de dispersión que se desvía de la dirección del haz en forma de aguja, una característica de radiación dispersa (de acuerdo con una sección transversal de dispersión diferencial) o una longitud de onda diferente del haz en forma de aguja.

La "radiación dispersa que se escapa" del haz en forma de aguja puede comprender (exclusivamente) radiación dispersa que se dispersa fuera de la dirección del haz. Mediante un filtro dicróico, en el caso de radiación fluorescente, también puede detectarse radiación dispersa en dirección del haz.

En el caso de radiación fluorescente como radiación dispersa, comprende "fluorescencia no resonante" el caso de una longitud de onda de fluorescencia (de la radiación fluorescente emitida como radiación dispersa) mayor en comparación con la longitud de onda de excitación (del haz en forma de aguja radiado para la excitación).

La detección sin resolución local puede ser sin resolución local en dirección del haz. La detección sin resolución local puede, además, ser sin resolución direccional. Preferiblemente, la detección sin resolución direccional es sin resolución direccional con respecto a una dirección de salida de la muestra.

El soporte de muestras puede ser transparente a radiación, al menos en una sección (también denominada "ventana") del soporte de muestras.

La detección de imágenes puede repetirse (mediante giro en torno al eje de giro) en diferentes posiciones de giro (es decir, diferentes direcciones de incidencia) del haz en forma de aguja (con respecto al soporte de muestras). Con complejidad más baja (de un objeto de muestra a ser representado), una cantidad de las diferentes posiciones de giro puede ser más baja. De esta manera, con un objeto de muestra bidimensional (como máximo), pueden detectarse dos diferentes posiciones de giro (y reconstruirse una imagen de la muestra mediante triangulación). El eje de giro puede discurrir a través del soporte de muestras. Esto incluye el caso, de que solo una prolongación lineal imaginaria de un eje de giro estructural discurre a través del soporte de muestras.

La fuente de luz puede ser estacionaria y el soporte de muestras puede ser giratorio en torno al eje de giro. Alternativamente, el soporte de muestras puede ser estacionario y la fuente de luz giratoria en torno al eje de giro.

5 El haz en forma de aguja puede presentar una abertura de haz definida dentro del soporte de muestras. El haz en forma de aguja puede ser, esencialmente, exento de divergencia dentro del soporte de muestras. El haz en forma de aguja puede presentar un tamaño de haz dentro del soporte de muestras con una longitud de Rayleigh, que es esencialmente igual o mayor que la longitud (la mitad) de la sección detectada.

10 La longitud de la sección detectada puede ser mayor en un múltiplo que la abertura de haz. La abertura de haz puede ser menor en un múltiplo que una o todas las dimensiones interiores del soporte de muestras, transversal con respecto a la dirección del haz. La sección detectada puede comprender todo el haz en forma de aguja que atraviesa el soporte de muestras.

15 La fuente de luz puede, además, estar configurada para generar el haz en forma de aguja en el espectro visible, en el espectro ultravioleta o en el espectro infrarrojo. En general, el haz en forma de aguja puede encontrarse en el espectro electromagnético con longitudes de onda (en el vacío) de 300 nm a 2000 nm. Este espectro es adecuado para la detección de imágenes no destructiva de una muestra con ácido desoxirribonucleico (ADN). Una región espectral preferida del haz en forma de aguja comprende 323 nm a 750 nm o 355 nm a 850 nm (en el caso de radiación fluorescente como radiación dispersa). En conexión con tomografía de absorción (por medio de un fotodetector de transmisión), el haz en forma de aguja puede (adicionalmente) presentar radiación de 200 nm a 323 nm (o bien, de 200 nm a 355 nm). Además, el haz en forma de aguja puede excitar, al menos parcialmente, en el espectro ultravioleta extremo (XUV) o en el espectro infrarrojo lejano (FIR) de la radiación dispersa. En el caso de muestras anhídricas, el haz en forma de aguja puede presentar (adicionalmente) radiación en la región por encima de 2000 nm. Para la excitación de multifotones de la radiación fluorescente (abreviado: "fluorescencia de multifotones"), cada una de las indicaciones de longitud de onda anteriores (de un límite de área espectral) puede multiplicarse con un factor de 2 (en el caso de una excitación de dos fotones), un factor de 3 (en el caso de una excitación de tres fotones), etc. Para la excitación de multifotones, la fuente de luz puede emitir pulsos intensivos cortos. Un láser de femtosegundos o un láser (con conmutación de Q) con duraciones de pulso de pocos picosegundos, puede utilizarse como fuente de radiación para la excitación de multifotones. La fluorescencia de multifotones puede posibilitar la detección de una mayor profundidad (en dirección del haz).

30 Alternativa o adicionalmente, la fuente de luz puede estar configurada para, por medio del haz en forma de aguja, generar segundos armónicos (es decir, duplicación de frecuencia) o armónicos altos, que aquí se denominan, en general, "armónicos más altos", en el soporte de muestras (es decir, en la muestra dado el caso utilizada). Este proceso (en el lenguaje técnico, normalmente, denominado "Higher Harmonic Generation" o "HHG") puede transformar varios (dos, tres o más) fotones (del haz en forma de aguja) a un fotón coherente. La "radiación dispersa" resultante de ello, puede (aproximadamente) presentar una frecuencia (y correspondiente longitud de onda más corta) más alta en un múltiplo entero que el haz en forma de aguja. La dirección de la "radiación dispersa" del HHG puede, fundamentalmente, ser en la dirección del haz (del haz en forma de aguja) u opuesta a la dirección del haz. La "radiación dispersa" del HHG es generable a lo largo de la sección del haz en forma de aguja dentro del soporte de muestras (y no solo en un punto focal). El HHG puede producirse también sin adición de denominados "marcadores" (a la muestra). Preferiblemente, para el HHG la fuente de luz para la generación del haz en forma de aguja es con polarización circular. La "radiación dispersa" del HHG puede, además, generar radiación dispersa (secundaria) en centros de dispersión dentro del soporte de muestras (es decir, en la muestra dado el caso utilizada). De manera ventajosa, mediante el haz en forma de aguja polarizado circular, es generable la radiación dispersa (secundaria) en los centros de dispersión, independiente de una orientación espacial de los centros de dispersión.

45 La unidad de detector comprende al menos un colector de radiación dispersa, que está configurado para, o que están configurados juntos para, detectar la radiación dispersa en un ángulo sólido en torno al soporte de muestras de al menos $0,12 \pi$ sr (o, al menos, $\pi/8$ sr), a modo de ejemplo, aproximadamente $0,4 \pi$ sr, y, preferiblemente, al menos 2π sr. El ángulo sólido detectado de $0,12 \pi$ sr puede corresponder a una eficiencia de fotones (máxima) del 3 %. Además, el ángulo sólido detectado de $0,12 \pi$ sr de una apertura numérica de aproximadamente $NA = 0,5$ (con utilización de un fluido de inmersión). En el aire, una apertura numérica de $NA = 0,5$ puede corresponder a un ángulo sólido detectado de $0,28 \pi$ sr (o una eficiencia de fotones máxima del 7 %). La radiación dispersa detectada de esta manera dentro del ángulo sólido, puede detectarse de manera coherente o incoherente. De manera ventajosa, no es necesario (pero posible), detectar la radiación dispersa de manera coherente. En particular, los recorridos de radiación de la radiación dispersa detectada también pueden presentar diferentes longitudes de onda ópticas, que difieren en más de una longitud de coherencia.

55 La unidad de detector puede comprender, además, como un emisor de señales, un detector semiconductor y/o un multiplicador de fotoelectrones ("Photomultiplier Tube", PMT). El detector semiconductor puede ser un fototransistor o un fotodiodo, preferiblemente, un fotodiodo de avalanchas ("Avalanche Photodiode", APD).

60 El soporte de muestras puede estar configurado para la aceptación de un medio de muestras líquido (viscoso). El soporte de muestras y/o un medio de muestras líquido (viscoso) dentro del soporte de muestras, pueden presentar un índice de refracción adaptado a la muestra.

Un primer colimador del colector de radiación dispersa puede comprender una lente fuertemente refractiva o una lente condensadora, que está configurada para la colimación de la radiación dispersa detectada. Alternativa o adicionalmente, el colector de radiación dispersa puede presentar, como primer colimador, un conductor de luz que se estrecha ("Tapered Light Pipe", TLP), que está configurado para la colimación de la radiación dispersa detectada. El conductor de luz puede ser una guía de onda de luz revestida con reflexión (del lado interior). Alternativamente, el conductor de luz puede ser una probeta maciza de vidrio, de modo que la radiación dispersa se guía mediante reflexión total (por ejemplo, al aire ambiente de la probeta maciza de vidrio). Alternativa o adicionalmente, la probeta maciza de vidrio puede estar metalizada por alto vacío con una capa dicróica. La capa dicróica puede reflejar la radiación dispersa para ángulos de incidencia agudos (es decir, ángulos de incidencia pequeños hacia la normal de superficie interior de la guía de onda de luz). Esto puede posibilitar, que para ángulos agudos entre reflexión (en la capa dicróica) y para ángulos planos (es decir, para ángulos de incidencia grandes con la normal de superficie interior de la guía de onda de luz) entre reflexión total.

La unidad de detector puede, además, presentar uno o varios filtros fluorescentes intercambiables, que son esencialmente transparentes para la radiación fluorescente (como radiación dispersa). El o los filtros fluorescentes pueden ser esencialmente impenetrables en la gama del haz en forma de aguja. El filtro fluorescente puede ser un filtro cromático o un filtro dicróico.

Una unidad de selección de filtro puede comprender los múltiples filtros fluorescentes intercambiables. La unidad de selección de filtro puede estar configurada para disponer los filtros fluorescentes, opcionalmente (individuales), entre el primer colimador y el emisor de señales. De esta manera, la unidad de selección de filtro puede comprender un disco de rueda giratorio, en el que están enmarcados circunferencialmente los múltiples filtros fluorescentes. El filtro fluorescente intercambiable puede ser seleccionable mediante el giro. Alternativamente, la unidad de selección de filtros puede ser una corredera desplazable, a lo largo de la que están enmarcados los múltiples filtros fluorescentes. El filtro fluorescente intercambiable puede ser seleccionable mediante desplazamiento.

La unidad de detector puede presentar un segundo colimador, que está dispuesto entre el filtro fluorescente y el emisor de señales para el agrupamiento de la radiación dispersa detectada.

La unidad de detector puede comprender varios colectores de radiación dispersa. La unidad de detector puede comprender, además, un emisor de señales asociado a todos los colectores de radiación dispersa, o varios emisores de señales asociados, respectivamente, a uno de los colectores de radiación dispersa. Las salidas de señal de los múltiples emisores de señales pueden totalizarse. Las salidas de señal pueden totalizarse analógicamente, preferiblemente, al interconectarse las salidas de señal. Alternativa o adicionalmente, las salidas de señal pueden totalizarse digitalmente, de manera preferida, al estar conectado o ser conectable un convertidor de analógico a digital con cada una de las salidas de señal para a digitalización separada, y una unidad de cálculo está conectada o es conectable con el convertidor de analógico a digital para la adición de las salidas de señal digitalizadas.

El colector de radiación dispersa puede, además, presentar al menos un integrador que envuelve esencialmente al soporte de muestras. Una superficie interior (orientada hacia el soporte de muestras) del integrador puede ser una superficie interior que refleja difusivamente. La superficie interior del integrador puede presentar una forma de paralelepípedo. Alternativamente, el integrador puede ser una esfera de Ulbricht. Una dimensión lineal del integrador, preferiblemente, una longitud de arista o un diámetro del integrador, puede estar dimensionado tan pequeño que un tiempo de propagación de luz, correspondiente a la dimensión lineal, es más corto que un período de desintegración de la radiación fluorescente excitada mediante el haz en forma de aguja. En este caso, la dimensión lineal puede estar además multiplicada con una cantidad (media) de reflexiones o dispersiones (dentro del integrador). El período de desintegración de la radiación fluorescente (es decir, un tiempo de vida fluorescente) puede ser detectable de esta manera, en particular, cuando la propagación (de una señal) temporal de la radiación dispersa a través de las distancias recorridas de luz diferentemente largas, es pequeña en comparación con el período de desintegración. El primer colimador puede estar dispuesto para absorber radiación dispersa en una abertura de medición en el integrador, dispuesta esencialmente perpendicular con respecto a la dirección del haz

El elemento de regulación óptico de la fuente de luz puede comprender:

- al menos un espejo reticulado y
- uno o varios actuadores acoplados con el al menos un espejo reticulado para el movimiento del espejo reticulado.

En particular, el elemento de regulación óptico puede estar configurado como óptica de relé con:

- un primer espejo reticulado accionado por un primer actuador para el desplazamiento del haz en forma de agua en una primera dirección reticulada,
- un segundo espejo reticulado accionado por un segundo actuador para el desplazamiento del haz en forma de aguja en una segunda dirección reticulada esencialmente perpendicular con respecto a la primera dirección reticulada y

- una lente, dos lentes o un sistema de lentes (entre el primer espejo reticulado y el segundo espejo reticulado), que está configurado para proyectar el primer espejo reticulado sobre el segundo espejo reticulado.

El elemento de regulación óptico puede ser accionable controlado por tensión, preferiblemente, de manera piezoeléctrica. De esta manera, se puede utilizar un cristal piezoeléctrico como actuador. Alternativamente, el elemento de regulación óptico puede estar controlado por electricidad, preferiblemente, por medio de un galvanómetro de electroimán de giro o un galvanómetro de bobina de giro. De esta manera, como actuador se puede utilizar un galvanómetro (también denominado galvo-escáner). Alternativamente, el elemento de regulación óptica (para cada una de las dos direcciones reticuladas) puede presentar un escáner de polígono. El escáner de polígono comprende un polígono de espejo y un motor, sobre cuyo eje está dispuesto rotatorio el polígono de espejo. El polígono de espejo es un cilindro con un polígono regular como superficie base, cuyas superficies laterales están reflejadas. Además, el elemento de regulación óptico (para cada una de las dos direcciones reticuladas o para una dirección reticulada de collar) puede presentar un modulador acústico-óptico (AOM). Como elemento de regulación óptico, el AOM también se denomina "Acousto Optic Deflector" (AOD). El AOM comprende un cuerpo sólido transparente a haz de rayos, en el que un piezoelemento dispuesto transversal con respecto a la dirección del haz, es capaz de crear una onda sonora continua con una frecuencia ultrasónica. Para el reticulado rápido (es decir, para el desplazamiento del haz en forma de aguja), la frecuencia ultrasónica es variable.

El uno o los varios actuadores pueden estar configurados para mover los espejos reticulados esencialmente perpendiculares con respecto a la dirección del haz o para pivotarlos en torno a un eje pivotante esencialmente perpendicular con respecto a la dirección del haz. Para el desplazamiento del haz en forma de aguja en una primera dirección reticulada y en una segunda dirección reticulada no paralela con respecto a la primera dirección reticulada, puede estar previsto un primer actuador o bien un segundo actuador de los múltiples actuadores. La primera dirección reticulada es, de manera preferida (esencialmente) paralela con respecto al eje de giro.

La fuente de luz puede presentar, además, una fuente de radiación y una óptica de conformación de haces, que está dispuesta entre la fuente de radiación y el elemento de regulación óptico. La óptica de conformación de haces puede comprender una óptica de telescopio para la ampliación del haz. Además, la óptica de conformación de haces puede comprender un diafragma circular y un axicón para la generación de un haz de Bessel como haz en forma de aguja. Alternativa o adicionalmente, la óptica de conformación de haces puede comprender una lámina de fase espiral ("Spiral Phase Plate" o "Vortex Phase Plate") para la generación del haz en forma de aguja con vórtice óptico o modo Laguerre-Gaussiano ("Doughnut Mode").

La fuente de luz puede presentar, además, una óptica de focalización, que está dispuesta entre el elemento de regulación óptico y el soporte de muestras. La óptica de focalización puede comprender una lente de focalización o un sistema de lentes de focalización para la creación del rayo del haz en forma de aguja (con una abertura de haz definida dentro del soporte de muestras). Preferiblemente, la óptica de focalización presenta una óptica de telescopio y una lente de focalización. Para la ventaja de una mayor resolución, la óptica de focalización puede ensanchar el haz (después de los espejos reticulados). De esta manera, una abertura de los espejos reticulados puede ser menor que la abertura de haz. La lente de focalización puede radiar el haz en forma de aguja en el soporte de muestras con una apertura numéricamente mayor. De esta manera, es alcanzable una apertura numérica radiada de $NA_E = 0,2$. (La apertura numérica radiada, NA_E , no debe confundirse con la apertura numérica detectada, NA .) Un primer plan focal de la lente de focalización puede comprender (esencialmente) una posición del espejo reticulado. Un segundo plano focal de la óptica de focalización puede comprender (esencialmente) una posición dentro del soporte de muestras, preferiblemente, una posición del tamaño de haz o del eje de giro dentro del soporte de muestras.

El dispositivo puede comprender, además, una unidad de cálculo, que está conectada o es conectable con el emisor de señales de la unidad de detector, para la transmisión de un conjunto de datos con datos de intensidad desde el emisor de señales a la unidad de cálculo. Los datos de intensidad pueden representar intensidades de la radiación dispersa detectada. El elemento de regulación óptico puede estar configurado para (controlado mediante la unidad de cálculo) desplazar el haz en forma de aguja (gradualmente o continuado) en una pluralidad de diferentes posiciones de medición. El conjunto de datos puede ser un conjunto de datos reticulado, que comprende datos de intensidad de cada una de la pluralidad de posiciones de medición.

El dispositivo puede comprender, además, un motor (controlado mediante la unidad de cálculo) para el giro (gradual o continuo) del soporte de muestras y de la fuente de luz uno con respecto al otro en una pluralidad de diferentes posiciones de giro. El conjunto de datos puede ser un conjunto de datos tomográfico, que comprende un conjunto de datos reticulado para cada una de la pluralidad de posiciones de giro.

La unidad de cálculo puede estar, además, configurada para, en base al conjunto de datos tomográfico, reconstruir una imagen seccional o una imagen espacial. La imagen reconstruida puede representar un coeficiente de dispersión (de una muestra en el soporte de muestras) y/o (adicionalmente) un coeficiente de extinción (de la muestra en el soporte de muestras). La reconstrucción puede comprender una transformación de Radon inversa. Alternativa o adicionalmente, la reconstrucción puede comprender una reconstrucción iterativa. La unidad de cálculo puede, además, estar configurada para corregir una extinción del haz en forma de aguja de acuerdo con la ley de Lambert-Beer o tenerla en cuenta durante la reconstrucción.

La misión se resuelve, además, mediante un procedimiento para la detección de imágenes tomográfica con los pasos de procedimiento de la reivindicación 14.

Breve descripción de los dibujos

5 Otras ventajas y características de la invención resultan de los siguientes ejemplos de realización descritos mediante dibujos esquemáticos. Muestran:

la Fig. 1, una vista en planta de un primer ejemplo de realización del dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con un integrador,

la Fig. 2a y 2b, una vista en planta o bien una vista lateral de un segundo ejemplo de realización del dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con un recipiente de muestras reflectante,

10 la Fig. 3, una vista en planta de un tercer ejemplo de realización del dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con un reflector,

la Fig. 4, una vista en planta de un cuarto ejemplo de realización del dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con varios colectores con varios colectores de radiación dispersa,

15 la Fig. 5, una vista en planta de un quinto ejemplo de realización del dispositivo para la detección de imágenes tomográfica con una escotadura del colimador y

la Fig. 6, un diagrama de flujo de un procedimiento para la detección de imágenes tomográfica.

Descripción detallada

Los símbolos de referencia de diferentes ejemplos de realización con dos cifras finales iguales se refieren a elementos funcionales del mismo tipo (e intercambiables entre los ejemplos de realización).

20 La Fig. 1 muestra un dispositivo, referenciado en general con 10, para la detección de imágenes tomográfica. El dispositivo 10 comprende una fuente 12 de luz, un soporte 14 de muestras y una unidad 16 de detector.

La fuente 12 de luz comprende una fuente 18 de radiación, que emite al menos un haz 20 en bruto esencialmente coherente espacialmente. En el ejemplo de realización mostrado, la fuente 18 de radiación es un láser. En caso de que una amplitud w del haz 20 en bruto proporcionado por la fuente 18 de radiación sea muy pequeña, una óptica 22 de conformación de haces comprende una óptica 24 de telescopio que ensancha el haz 20 en bruto.

Independientemente de la fuente 18 de radiación utilizada, la óptica 22 de conformación de haces comprende diferentes filtros y máscaras 26 de fase, que modifican el haz 20 en bruto a un haz 28 conformado. La óptica 22 de conformación de haces posibilita variar las propiedades de imagen del dispositivo 10. De esta manera, una resolución lograda con el dispositivo 10 puede aumentarse y adaptarse continua, en particular, bajo consideración de una intensidad de haz máxima dependiente de la muestra. Además, los filtros o máscaras 26 de fase proyectan el haz 28 conformado sobre un elemento 30 de regulación óptico de la fuente 12 de luz subordinado en la trayectoria de los rayos.

Opcionalmente, entre la óptica 22 de conformación de haces y el elemento 30 de regulación óptico, puede estar montado un divisor 32 de haz, que separa un haz 34 parcial del haz 28 conformado en un detector 36 de referencia. En el ejemplo de realización mostrado, como detector 36 de referencia se utiliza un fotodiodo. El detector 36 de referencia supervisa, por un lado, la estabilidad del láser de la fuente 18 de radiación. Por otro lado, el detector 36 de referencia funciona (como emisor de señales de un circuito de control no mostrado) para la modulación de intensidad apropiada de la fuente 18 de radiación. En la modulación de intensidad se parte, básicamente, de una intensidad aumentada para la iluminación de muestras. Un rango dinámico (de cada uno de los detectores descritos a continuación, en particular, la unidad 16 de detector) del lado del detector está vacío, en caso de que la fuente 18 de radiación provoque una sobreexcitación o saturación de señal. La intensidad de la fuente 18 de radiación se reduce tanto de manera apropiada para detecciones parciales individuales (de manera ideal, para cada una de las posiciones de medición descritas a continuación del elemento 30 de regulación óptico), hasta que no exista una sobreexcitación del lado del detector. Mediante la modulación de intensidad, se multiplica un (determinado por la fuente 18 de radiación y el detector 36 de referencia) rango dinámico del lado de la generación con el rango dinámico del lado del detector a un (ampliado y de ruido débil) rango dinámico de la detección.

El elemento 30 de regulación óptico posibilita desplazar el recorrido de un haz 38 en forma de aguja a través del soporte 14 de muestras esencialmente paralelo con respecto a la dirección 40 del haz. Una posición de medición (transversal) del elemento 30 de regulación óptico se describe en un sistema de coordenadas rectangular (o perpendicular) con respecto a la dirección 40 del haz mediante un desplazamiento-x y un desplazamiento-y. En una realización simplificada, el elemento 30 de regulación óptico comprende solo un elemento 42 de regulación-x con un actuador-x 44 que inclina un espejo 46 reticulado-x. Un eje pivotante-x de la inclinación-x, corresponde al eje-y del sistema de coordenadas transversal (y está, por lo tanto, perpendicular con respecto a la dirección 40 del haz). En el

ejemplo de realización mostrado, el elemento 30 de regulación óptico comprende, además, un elemento 48 de regulación-y con un actuador-y 50, que inclina un espejo 52 reticulado-y en torno a un eje pivotante-y (que corresponde al eje-x del sistema de coordenadas transversal). En una realización alternativa (no mostrada) del elemento 30 de regulación óptico, un único espejo reticulado se inclina mediante el actuador-x 44 y el actuador-y 50 en torno al eje pivotante-x o bien al eje pivotante-y. Como actuadores 44, 50 se utilizan galvanómetros (también denominados "galvos" o "galvo-escáner"). Los actuadores 44 y 50 comprenden, respectivamente una regulación automática, que detecta una posición de giro de los espejos 46 o bien 52 reticulados y regula una corriente para lograr el desplazamiento deseado.

El elemento 30 de regulación óptico, más concretamente, el último de los dos espejos 46, 52 reticulados en el recorrido del haz, se encuentra en un primer plano focal trasero de una óptica 54 de focalización de la fuente 12 de luz. El elemento 30 de regulación óptico deflece (mediante reflexión) el recorrido del haz alrededor de un eje óptico de la óptica 54 de focalización. La óptica 54 de focalización, está configurada para proyectar el haz 38 en forma de aguja en el soporte 14 de muestras, con un tamaño de haz en el centro de una sección del haz 38 en forma de aguja dentro del soporte de muestras (correspondiente a un segundo plano focal de la óptica 54 de focalización). Mediante deflexión (por medio del último espejo 52 reticulado en el recorrido del haz) en el primer plano focal de la óptica 54 de focalización, se logra una proyección telecéntrica del haz 38 en forma de aguja (en el soporte 14 de muestras). Ésta permite un desplazamiento paralelo también para ángulos de deflexión grandes (correspondientes a un ángulo de inclinación duplicado de los espejos 46, 52 reticulados). Desviaciones de un desplazamiento del haz paralelo (con respecto a la dirección 40 del haz) podrían complicar una posterior reconstrucción de imagen. El desplazamiento paralelo del haz en forma de aguja posibilita una rápida reconstrucción de imagen (tomográfica) mediante inversión de una transformación de Radon. Alternativo a la inclinación del al menos un espejo 46, 52 reticulado, la fuente de luz puede desfasarse (con respecto al soporte 14 de muestras).

En una realización no mostrada de la fuente 12 de luz sin disposición telecéntrica (del elemento 30 de regulación óptico y de la óptica 54 de focalización), también es alcanzable una detección de imágenes tomográfica. En este caso, el desplazamiento provocado por el elemento 30 de regulación óptico del haz 38 en forma de aguja, obtiene la dirección 40 del haz, al menos en la medida que, como el desplazamiento (transversal) (en el soporte 14 de muestras) es pequeño en comparación con la longitud de onda (óptica) entre el elemento 30 de regulación óptico y el soporte 14 de muestras. Con otras palabras: el paralelismo del desplazamiento del haz en forma de aguja en el soporte de muestras está dado (aproximadamente) para ángulos de inclinación pequeños del elemento 30 de regulación óptico. Además, también con apilamiento mayor del haz 38 en forma de aguja (en el lugar del soporte de muestras, alrededor de la dirección 40 del haz ideal en diferentes posiciones de medición) mediante procedimientos directos o iterativos adaptados, es reconstruible una imagen (tomográfica).

Una primera realización (no mostrada) del soporte 14 de muestras está configurada para posicionar directamente una muestra. Para ello, el soporte 14 de muestras puede presentar una fijación con grapas para la muestra, un tornillo tensor para sujetar la muestra o una superficie adhesiva para adherir la muestra. De esta manera, se pueden girar (lentamente) muestras grandes. Una segunda realización (no mostrada) del soporte 14 de muestras, está configurada para el posicionamiento de un volumen de gel (preferiblemente gel de agarosa). La muestra puede encerrarse en el volumen de gel (mediante fundición y gelificación). La tercera realización mostrada del soporte 14 de muestras, comprende tubo de vidrio pequeño lleno con un líquido con índice de refracción adaptado, en el que se puede infiltrar la muestra. Básicamente, se puede adaptar un índice de refracción de la muestra, alternativa o adicionalmente a una adaptación (toda descrita en el presente documento) del índice de refracción del medio de la muestra. Para técnicas para la adaptación del índice de refracción de la muestra, se hace referencia al documento EP 1520173 B1 (y, en particular, a los párrafos [0013] y siguientes dentro).

El soporte 14 de muestras está dispuesto giratorio en un recipiente 56 de muestras, preferiblemente en una cubeta. Un líquido (que en el caso de la tercera realización del recipiente 14 de muestras coincide al menos con respecto a su índice de refracción con el líquido mencionado anteriormente) adaptado al índice de refracción en la muestra, se encuentra entre el soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras. El giro se refiere a un giro relativo entre, por un lado, soporte 14 de muestras y, por otro lado, al menos de la fuente 12 de luz y el recipiente 56 de muestras. Básicamente, un "límite" o "intersección" del giro discurre entre el soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras (en particular, dado que el recipiente 56 de muestras puede presentar ventanas de entrada y de salida descritas anteriormente para el haz 38 en forma de aguja, cuya posición para la reconstrucción simplificada no debería girarse con respecto al haz 38 en forma de aguja). Un eje del giro es vertical (perpendicular con respecto al plano del dibujo de la Fig. 1, correspondiente a la dirección-y). El eje de giro (imaginario) del giro discurre a través del soporte 14 de muestras. En el ejemplo de realización mostrado en la Fig. 1, el soporte 14 de muestras el cilíndrico y el eje de giro coincide con el eje del cilindro. En una primera variante, está previsto un órgano motor eléctrico, preferiblemente, un motor paso a paso (correspondiente al motor paso a paso referenciado con 88 en el ejemplo de realización de la Fig. 2), para el giro del soporte 14 de muestras. La fuente 12 de luz y la unidad 16 de detector son estacionarias. En una segunda variante el órgano motor eléctrico está configurado para el giro de todos los demás elementos funcionales del dispositivo 10 con respecto al soporte 14 de muestras inmóvil.

En particular, para un dispositivo 10 móvil, todos los elementos funcionales, excepto el espejo 46, 52 reticulado y el soporte 14 de muestras, están unidos fijos entre sí. Además, en la segunda variante se puede examinar una muestra

fija o inmóvil, por ejemplo, una planta crecida, girándose el recipiente 56 de muestras y toda la fuente 12 de luz en torno a la muestra. En este caso, para la examinación de muestras más grandes se puede renunciar al recipiente 56 muestras (y con muestras fijas incluso al soporte 14 de muestras).

5 Con el dispositivo 10, también puede detectarse tomográficamente una muestra opaca. La luz dispersa detectada sin resolución local puede, en este caso, reflejarse esencialmente en la superficie de la muestra opaca o dispersarse mediante cualquier otro efecto. La muestra opaca puede tener una estructura superficial detectable tomográficamente. Por ejemplo, la superficie de la muestra puede presentar al menos un revestimiento parcialmente transparente. La luz dispersa puede comprender proporciones dispersas y proporciones reflectantes. La proporción dispersa puede estar provocada mediante dispersión del haz en forma de aguja en el revestimiento. La proporción reflectante puede estar provocada mediante reflexión del haz en forma de aguja o del haz en forma de aguja disperso hacia delante en la superficie de la muestra opaca. Un tornillo es un ejemplo para la muestra opaca.

10 Para el posicionamiento espacial de la muestra, en otra primera variante o la variante mencionada previamente, el soporte 14 de muestras (y síncrono a ello, el recipiente 56 de muestras) es desplazable, por medio de una mesa de desplazamiento de micrómetros, en todas las tres direcciones (es decir, en dirección-x, dirección-y y dirección 40 del haz). En otra segunda variante o la segunda variante mencionada previamente, el soporte 14 de muestras (y el recipiente 56 de muestras) es estacionario, y la fuente 12 de luz y la unidad 16 de detector (o todos los demás elementos funcionales, excepto el soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras) son desplazables en todas las tres direcciones. En un ejemplo de realización simplificado (de la primera variante o de la segunda variante), la desplazabilidad está limitada a la dirección vertical (es decir, la dirección-y).

20 Existe una inclinación del eje de giro, en caso de que

(A) el eje de giro no esté perpendicular con respecto a la dirección 40 del haz o

(B) el eje de giro no esté perpendicular con respecto a la dirección-x del elemento 30 de regulación óptico.

En general, existe la inclinación de los casos (A) y (B) combinados. Con otras palabras: existe una inclinación, cuando el eje de giro no es paralelo espacialmente con respecto al eje-y.

25 La inclinación puede complicar la posterior reconstrucción de imagen o causar artefactos inclinados en la imagen reconstruida. Para el ajuste del dispositivo 10, en particular, para la compensación de la inclinación, están previstos mecanismos de ajuste, que posibilitan un pivoteo del eje de giro (y, con ello, también del soporte 14 de muestras) con respecto a la dirección 40 del haz. Objetivo de los mecanismos de ajuste, es orientar el eje de giro paralelo con respecto al eje-y como dirección espacial.

30 Con respecto a la inclinación del caso (A), el elemento 30 de regulación óptico y la óptica 54 de focalización, son desplazables uno con respecto al otro mediante un primer mecanismo de ajuste. De esta manera, la óptica 54 de focalización puede desplazarse perpendicular con respecto al eje óptico de la óptica 54 de focalización. Alternativamente, el elemento 30 de regulación óptico puede desplazarse perpendicular con respecto al eje óptico de la óptica 54 de focalización. (Básicamente, también es posible desplazar toda la fuente de luz hasta la óptica 54 de focalización.) Mediante el desplazamiento en dirección-y, un recorrido del haz en forma de aguja es ajustable ascendente o descendente con respecto a la dirección-y. De esta manera, es ajustable un ángulo recto entre el eje de giro y la dirección 40 del haz (en el plano tendido por la dirección 40 del haz y la dirección-y). Alternativa o adicionalmente al desplazamiento, el primer mecanismo de ajuste posibilita pivotar el eje de giro en torno al eje-x. También, con ello, es ajustable (en el plano tendido por la dirección 40 del haz y la dirección-y) un recorrido perpendicular del haz en forma de aguja con respecto al eje de giro.

40 Con respecto a la inclinación del caso (B), un segundo mecanismo de ajuste posibilita pivotar el eje de giro (y, con ello, también el soporte 14 de muestras) en torno al eje óptico de la óptica 54 de focalización. Alternativamente, también puede pivotarse el elemento 30 de regulación óptico en torno al eje óptico de la óptica 54 de focalización. A causa de esto, se puede llevar a cubrir el eje de giro con la dirección-y. Además, la inclinación del caso (B) (a diferencia de la inclinación del caso (A)) también es compensable mediante un giro numérico de los datos en bruto detectados (en una posición de giro) en el plano-xy.

50 Al evitarse la inclinación en la construcción óptica, una posterior reconstrucción puede desacoplarse por capas. Una "capa" comprende todas las detecciones en posiciones de medición con la misma posición en dirección-y (es decir, en la misma "altura"). La reconstrucción de la detección de imágenes tomográfica puede paralelizarse para diferentes capas. Siempre que exista la inclinación, se producen dependencias (entre detecciones con diferentes posiciones en dirección-y), que básicamente no impiden una reconstrucción de imagen tomográfica. Sin embargo, la consideración de las dependencias puede aumentar la complejidad de un algoritmo de reconstrucción.

55 Siempre que se utilicen dos espejos 46, 52 reticulados en el elemento 30 de regulación óptico, en una realización sencilla (del elemento de regulación óptico), el elemento 30 de regulación óptico puede estar dispuesto con respecto a la óptica 54 de focalización, de modo que el primer plano focal de la óptica 54 de focalización se encuentre entre los espejos 46 y 52 reticulados. De esta manera, se puede minimizar un apilamiento del haz 38 en forma de aguja (es decir, una desviación de la dirección 40 del haz uniforme de manera ideal). Alternativamente, en el primer plano

focal de la óptica 54 de focalización puede estar dispuesto, bien, el espejo 46 reticulado-x o el espejo 52 reticulado-y. De esta manera, puede limitarse el apilamiento a la reticulación en dirección-y o bien en dirección-x (y tenerse en cuenta por el algoritmo de reconstrucción). Está previsto otro mecanismo de ajuste, que es capaz de desplazar los dos espejos 46 y 52 reticulados (en dirección-x o bien en dirección 40 del haz). Otra realización ampliada del elemento 30 de regulación óptico comprende la óptica de relé mencionada al principio. Por medio de la óptica de relé, se puede disponer tanto el espejo 46 reticulado-x al igual que también el espejo 52 reticulado-y en, respectivamente, un plano focal (de la óptica de relé). El último espejo 52 reticulado en el recorrido del haz, se encuentra, además, en el primer plano focal de la óptica 54 de focalización. De esta manera, es minimizable un apilamiento en dirección-x y en dirección-y. Para formas de realización simplificadas, se renuncia a mecanismos de ajuste individuales o a todos.

El volumen entre el soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras, está lleno con un líquido 58 (a la altura del haz 38 en forma de aguja) aproximado al índice de refracción del soporte 14 de muestras (y de la muestra a ser examinada dentro). El líquido 58 sirve como fluido de inmersión. Al humedecer el líquido 58 el soporte 14 de muestras, la superficie (en general, curvada) del soporte 14 de muestras se elimina prácticamente como superficie límite óptica (con respecto a refracción o dispersión no deseada). El haz focalizado en general débil a través de la óptica 54 de focalización, se proyecta en el recipiente 56 de muestras mediante una superficie 59 de vidrio lisa del recipiente 56 de muestras. "Lisa" significa, que la superficie 59 de vidrio es plana (es decir, no curvada). Además, "lisa" puede comprender una rugosidad superficial reducida (lo más posible).

La radiación transmitida a través de la muestra, se proyecta por una segunda óptica 60 de focalización sobre un fotodetector 62 de transmisión. Un primer plano focal de la segunda óptica 60 de focalización, coincide con el segundo plano focal de la primera óptica 54 de focalización. Un segundo plano focal trasero de la segunda óptica 60 de focalización, coincide con una posición del fotodetector 62 de transmisión. En este caso, no es necesario un posicionamiento exacto de los planos focales de la segunda óptica 60 de focalización. Los requisitos de las propiedades de proyección de la segunda óptica 60 de focalización son menores que las de la primera óptica 54 de focalización.

Para la ventaja de un mayor rango dinámico cubierto por el fotodetector 62 de transmisión y para la mejora del rango dinámico de detección (sin pérdidas de velocidad en la detección de imágenes), el fotodetector 62 de transmisión posee un comportamiento de respuesta no lineal, preferiblemente, un comportamiento de respuesta logarítmico. La "velocidad" de la detección de imágenes se refiere, en particular, a la duración de iluminación por posición de medición. Además, el logaritmo de intensidades son datos de salida más ventajosos (dado que son transformables directamente) para la reconstrucción asistida por computadora.

En conexión con la unidad 60, 62 de detector de transmisión, además, son realizables microscopia de campo oscuro, microscopia de polarización, microscopia con contraste de interferencia (que también se denomina "Differential Interference Contrast Microscopy" o "DIC Microscopy") o microscopia con contraste de fase.

En un ejemplo de realización simplificado, se renuncia a la segunda óptica 60 de focalización y al fotodetector 62 de transmisión. En un ejemplo de realización adicional, está previsto, además, un filtro entre la segunda óptica 60 de focalización y el fotodetector 62 de transmisión para la limitación de la dispersión hacia delante. Al estar dispuesto el filtro (en lugar del fotodetector 62 de transmisión) en el segundo plano focal (trasero) de la segunda óptica 60 de focalización, es detectable por separado la dispersión hacia delante, que sale de la sección total del haz en forma de aguja en el soporte 14 de muestras. En el caso de fluorescencia no resonante, la transmisión y la dispersión hacia delante pueden separarse, además, mediante un filtro dicróico.

De la muestra sale radiación 64 dispersa a causa del haz 38 en forma de aguja que incide. A menudo, la radiación 64 dispersa que se emite por la muestra está distribuida prácticamente isotrópica (es decir, esencialmente regular en todas direcciones). En el caso de radiación fluorescente como radiación 64 dispersa, la fuente 18 de radiación está configurada para generar un haz 38 en forma de aguja, que excita una o varias transiciones seleccionadas de un flúóforo (que marca funcional o estructuralmente la muestra) en la muestra. La intensidad de la radiación 64 dispersa reemitida, se detecta en forma de una distribución de intensidad dispersa, $I(x, y, \pi)$, detectada, en diferentes posiciones de medición en las direcciones x e y , así como diferentes posiciones π de giro. En general, la distribución de intensidad dispersa detectada (mediante reconstrucción tomográfica accesible), incluye informaciones acerca de la concentración de flúóforo, $\rho(x, y, z)$, en la muestra (en el caso de la radiación fluorescente) o del coeficiente de dispersión, $\sigma(x, y, z)$, de la muestra (en el caso de otro mecanismo de dispersión). Para una posición π de giro dada, la distribución $I(x, y, \pi)$ de intensidad dispersa (integral), es una información de 2 dimensiones, que resulta a partir de la intensidad $\sigma(x, y, z)$ de dispersión de 3 dimensiones (esencialmente, mediante proyección en la dirección 40 del haz o totalización a lo largo del haz 38 en forma de aguja).

La radiación 64 dispersa se detecta integralmente por medio de la unidad 16 de detector. La detección integral de la radiación 64 dispersa comprende la detección sin resolución local y sin resolución direccional de la radiación 64 dispersa provocada mediante el haz 38 en forma de aguja.

La unidad 16 de detector comprende un colector 66 de radiación dispersa para la detección integral de la radiación 64 dispersa en un ángulo sólido lo más grande posible en torno al soporte 14 de muestras. El ángulo sólido

detectado corresponde a una (normalizada al índice de refracción) apertura numérica NA/n . Para la detección integral de la radiación 64 dispersa, el soporte 14 de muestras (y el recipiente 56 de muestras) está dispuesto en el centro de un integrador 68 del colector 66 de radiación dispersa. El integrador 68 comprende una cápsula altamente reflectante en el interior y que dispersa luz intensamente. Una superficie 69 interior del integrador 68 está revestida con sulfato de bario (u otro medio que disperse). En una realización más sencilla del integrador 68, la superficie 69 interior presenta una superficie base rugosa, sobre la que está depositada en fase de vapor una capa metálica (preferiblemente, de plata). El ejemplo de realización mostrado en la Fig. 1, utiliza una esfera de Ulbricht como integrador 68. Mediante la (múltiple) reflexión dispersa, la radiación dispersa (que sale de la muestra) se distribuye de forma homogénea en el interior del integrador 68. La homogeneidad tiene (con reflexión dispersa prácticamente sin pérdidas) como consecuencia varios aspectos técnicos. Por un lado, en la construcción y producción del dispositivo 10, no es necesario un posicionamiento exacto del soporte 14 de muestras (y del recipiente 56 de muestras) en el centro del integrador 68. De esta manera, como integrador 68 son adecuados los cuerpos huecos que se desvían de una forma esférica. En una realización compacta, el integrador 68 está realizado mediante el recipiente 56 de muestras revestido correspondientemente. Por otro lado, la intensidad de la radiación dispersa es esencialmente igual de grande en otras las aberturas 70, 72, 74 del integrador 68.

La proporción de la radiación 64 dispersa que sale en la abertura 72 de medición, corresponde, en relación con toda la radiación 64 dispersa de acuerdo con un comportamiento de abertura de la abertura 72 de medición a una superficie de abertura (que comprende las aberturas 70, 72 y 74) completa del integrador 68. De esta manera, para la detección integral de la radiación 64 dispersa, toda la radiación 64 dispersa es determinable mediante detección de la radiación dispersa que sale en la abertura 72 de medición.

Para una relación de señal al ruido alta, la abertura 72 de medición del integrador 68 se elige lo más grande posible, y todas las demás aberturas 70, 74 en el integrador 68 se eligen lo más pequeñas posibles. Para mejorar el comportamiento de abertura, en una variante optimizada del ejemplo de realización, está previsto únicamente un elemento 42 de regulación-x (como se ha descrito anteriormente) y la abertura 70 de iluminación es una ranura lo más estrecha posible en dirección-y (y que discurre en dirección-x). De manera similar, la abertura 74 de transmisión es una ranura (lo más estrecha posible en dirección-y) en dirección-x. Una altura Δy de ranura asciende del 100 % al 500 %, preferiblemente, aproximadamente el 200 %, de una abertura del haz 38 en forma de aguja en la ranura. En una realización a modo de ejemplo, la abertura 70 de iluminación y la abertura 74 de transmisión son, respectivamente, una ranura $\Delta y = 0,5$ mm más alta y $\Delta x = 12$ mm más ancha, y la abertura 72 de medición es cuadrada con una longitud de arista de 10 mm. Por lo tanto, para la realización a modo de ejemplo, una eficiencia ideal, correspondiente al comportamiento de abertura, asciende a $100/112 = 89,3$ %.

Para, con el comportamiento de abertura mejorado mediante la forma de ranura, detectar también posiciones de medición con diferente desplazamiento-y, se utiliza (alternativamente al elemento 48 de regulación-y con el espejo 52 reticulado-y) un actuador-y, que desplaza el soporte 14 de muestras (preferiblemente, síncrono con el recipiente 56 de muestras) en dirección-y correspondiente al desplazamiento-y (arriba o abajo) deseado. En una variante alternativa del ejemplo de realización, el soporte 14 de muestras (y el recipiente 56 de muestras) es estacionario en dirección-y, siendo la fuente 12 de luz y la unidad 16 de detector (o todos los demás elementos funcionales, excepto el soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras) desplazables arriba y abajo en dirección-y.

Por motivos técnicos, es preferible un integrador 68 dimensionado lo más pequeño posible ante un integrador 68 más grande, a cuyas ventajas pueden pertenecer menores pérdidas de reflexión dispersa en la superficie 69 interior más pequeña y ranuras más estrechas en la abertura 70 de iluminación y la abertura 74 de transmisión.

La abertura 72 de medición debería ser igual de grande o más grande que la muestra, el soporte 14 de muestras o el recipiente 56 de muestras. (Un tamaño de la muestra posible puede ascender, aproximadamente, a 2 mm. Con muestras de mayor dimensión, la abertura 72 de medición también puede ser más pequeña que el tamaño de la muestra.) Más concretamente, la longitud de arista de la abertura 72 de medición cuadrada, debería ser más grande que una longitud del soporte 14 de muestras en la dirección 40 del haz. Dado que la radiación 64 dispersa homogenizada en el integrador 68 también cae sobre el soporte 14 de muestras, de esta manera, se puede atenuar una proporción de radiación dispersa múltiples veces en la abertura 72 de medición (y una correspondiente señal de trasfondo no deseada). En el caso de radiación fluorescente no resonante, el desplazamiento de longitud de onda atenúa, además, que la radiación fluorescente siga excitando fluorescencia.

En un perfeccionamiento del ejemplo de realización, es variable una anchura de ranura de la abertura 70 de iluminación y de la abertura 74 de transmisión. Además, instalaciones ópticas en el integrador 68 u ópticas en las aberturas 70, 72, 74 están configuradas para reducir aún más pérdidas en las aberturas 70, 72, 74.

El colector 66 de radiación dispersa comprende, además, un primer colimador 76, el cual es capaz de reducir la divergencia de la radiación dispersa que sale de la abertura 72 de medición. El primer colimador 76 comprende, bien, un conductor 76a de luz ("Tapered Light Pipe") que se estrecha; una lente 76b fuertemente refractiva, en particular, una lente condensadora; un espejo cóncavo (no mostrado) con abertura central; o una combinación que comprende dos o más de estos elementos. Como conductor de luz, es utilizable una guía de onda de luz (reflejada) revestida reflectiva o una guía de onda de luz (que aprovecha la reflexión total) dieléctrica. El primer colimador 76 mostrado en el ejemplo de realización de la Fig. 1 comprende la guía 76a de onda de luz y la lente 76b. La

divergencia de la radiación 78' dispersa colimada parcialmente en la salida de la guía 76a de onda de luz se reduce aún más por la lente 76b a la radiación 78 dispersa colimada.

5 En una alternativa (no mostrada), la abertura 72 de medición y el conductor 76a de luz están reemplazados por un haz de cables de fibra de vidrio. El haz de cables de fibra de vidrio comprende una pluralidad de fibras de vidrio, que discurren en forma de estrella (es decir, radiales), desde una esfera (que reemplaza, en este sentido, al integrador 68). Los extremos de las fibras de vidrio que absorben la radiación 64 dispersa del soporte 14 de muestras, están distribuidos de manera uniforme a través de la superficie 69 interior de la esfera. Las fibras de vidrio están configuradas para agrupar la radiación 64 dispersa en un plano. También en esta alternativa, se obtiene la radiación 78' dispersa colimada parcialmente, que, mediante los elementos mencionados anteriormente del colimador 76, se proyecta a radiación 78 dispersa colimada.

10 La radiación 78 dispersa colimada presenta una divergencia reducida con una divergencia residual. Una divergencia residual suficientemente reducida posibilita aplicar un filtro dicróico sobre la radiación 78 colimada. La mayoría de los filtros son aplicables después de un primer colimador 76, que logra una divergencia residual por debajo de +/- 30 °. Con utilización de filtros de vidrio coloreado, la radiación 64 dispersa no está sujeta a limitaciones de divergencia significativas. De esta manera, en un ejemplo de realización simplificado con filtros de vidrio coloreado, está previsto un primer colimador 76 sencillo (solo con uno de los elementos) o ningún primer colimador 76.

15 La radiación 78 dispersa colimada atraviesa, opcionalmente, un filtro de varios filtros, que están recopilados en una unidad 80 de selección de filtro configurada como rueda de filtros o corredera de filtros de la unidad 16 de detector. En el caso de radiación fluorescente, las zonas espectrales con alta transparencia de los filtros están adaptadas, respectivamente, a una transición de fluorescencia de uno o de diferentes fluóforos. Una radiación 82 dispersa filtrada resultante presenta la intensidad ser medida.

20 En ejemplos de realización adicionales, se utilizan espejos dicróicos (no mostrados) para la desintegración de diferentes componentes de color en diferentes caminos del haz. Los espejos dicróicos están dispuestos adicionalmente en o en lugar de la unidad 80 de selección de filtro. Esto posibilita una detección simultánea de los diferentes componentes de color incluidos en la radiación 64 dispersa.

25 La unidad 16 de detector comprende, además, un segundo colimador 84 y un emisor 86 de señales (dispuesto en un plano focal trasero del segundo colimador 84) para la fotodetección. En el ejemplo de realización mostrado en la Fig. 1, el segundo colimador 84 es una lente convergente, preferiblemente, una lente condensadora. Para la optimización de un rendimiento cuántico, el segundo colimador 84 focaliza la radiación 82 dispersa filtrada sobre el emisor 86 de señales, sin sobrepasar su apertura numérica. En el ejemplo de realización mostrado en la Fig. 1, el emisor 86 de señales es un multiplicador de fotoelectrones. Para una intensidad del haz lo más reducida posible provocada sobre la muestra, el multiplicador de fotoelectrones presenta una alta sensibilidad de reacción (y rendimiento cuántico).

30 Además, el emisor 86 de señales es desplazable (transversal con respecto a la dirección de la radiación 82 dispersa filtrada) para iluminar de forma óptima una superficie ópticamente sensible (superficie de detector) del emisor 86 de señales. De esta manera, la unidad 16 de detector puede conducir la radiación 64 dispersa de la abertura 72 de medición de forma eficiente sobre la superficie de detector.

35 Los siguientes procedimientos son realizables con el dispositivo 10 descrito: FLIM ("Fluorescence Lifetime Microscopy"), estando el tiempo de vida fluorescente y el tiempo de propagación de luz armonizados entre sí en el integrador 68 para la evitación de limitaciones mediante la dispersión difusa en el integrador 68; MPM (Multi-Photonen Microscopy); FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer"); FRAP ("Fluorescence Recovery after Photobleaching"); STED ("Stimulated Emission Depletion"), radiándose, después del haz 38 en forma de aguja, como haz de excitación un "haz de tubos" como haz de desconexión con distribución de intensidad esencialmente cilíndrica; FLIP ("Fluorescence Loss in Photobleaching"); denominada "Superresolution Microscopy"; microscopía de luz dispersa; eventualmente también pueden ser realizables: STORM ("Stochastic Optical Reconstruction Microscopy") y FCS ("Fluorescence Correlation Spectroscopy").

40 La Fig. 2 muestra un segundo ejemplo de realización de un dispositivo 210 para la detección de imágenes tomográfica. Para los elementos funcionales del segundo ejemplo de realización con mismo símbolo de referencia que en el primer ejemplo de realización es válido, en particular, con respecto a sus propiedades, naturaleza, función y su cooperación, lo correspondiente descrito anteriormente.

45 El segundo ejemplo de realización se diferencia del primer ejemplo de realización, dado que no está previsto un integrador 68 separado para la integración y homogenización de la radiación 64 dispersa detectada. Con otras palabras: para la detección integral de la radiación 64 dispersa, un colector 266 de radiación dispersa no comprende un integrador 68. El recipiente 256 de muestras transparente al haz, presenta en todas las superficies laterales (es decir, todas las superficies, excepto una superficie 272 de fondo transparente) una superficie 269 de reflexión. La superficie 269 de reflexión asume la función y el efecto de la superficie 69 interior (reflectante difusiva). De esta manera, el recipiente 256 de muestras también puede asumir la función y el efecto del integrador 68.

Una primera realización sencilla del recipiente 256 de muestras, es una cubeta de vidrio sin revestir. La radiación 64 dispersa, que tendencialmente se radia hacia la superficie 272 de fondo de la cubeta sin revestir, se conduce mediante reflexión total en la capa límite de aire de la cubeta hasta la superficie 272 de fondo. De esta manera, es detectable una proporción de aproximadamente 12,5 % de la radiación 64 dispersa. La proporción resulta mediante el ángulo de la reflexión total en la pared del recipiente 256 de muestras (es decir, de la superficie límite de cubeta a aire). En una segunda realización del recipiente 256 de muestras, un cuerpo base de vidrio (del lado exterior o del lado interior) presenta una capa de sulfato de bario o una capa metálica como superficie 269 de reflexión, como anteriormente descrito en relación con la superficie 69 interior. En una tercera realización del recipiente 256 de muestras, las superficies laterales de un cuerpo base metálico funcionan como superficie 269 de reflexión. En una cuarta realización del recipiente 256 de muestras, éste coincide con el recipiente 56 de muestras y está enmarcado de manera precisa en una caja de espejos (no mostrada) con superficies 269 de reflexión.

Para la radiación incidente del haz 38 en forma de aguja y, opcionalmente, para la detección de transmisión, el recipiente 256 de muestras presenta una abertura 270 de iluminación o bien una abertura 274 de transmisión. La abertura 270 de iluminación y, dado el caso, la abertura 274 de transmisión corresponden (funcionalmente) a la abertura 70 o bien a la abertura 74. Como se ha descrito antes en relación con las aberturas 70, 72, 74, para la minimización de pérdidas de radiación, las aberturas 270 y 274 están configuradas como ranuras estrechas en dirección-x y el elemento 30 de regulación óptico reticula el haz 38 en forma de aguja solo en dirección-x. Para la posición de medición con desplazamiento-y, el soporte 14 de muestras es desplazable en dirección-y con respecto a todos los demás elementos funcionales, siendo el soporte 14 de muestras o los demás elementos funcionales estacionarios, como se ha descrito anteriormente para el primer ejemplo de realización. La superficie 269 de reflexión presenta ranuras transparentes al haz opuestas como ranuras 270 y 274. En el caso del cuerpo base de vidrio, las aberturas 270, 274 están sin revestir. En el caso del cuerpo base metálico, las aberturas 270, 274 comprenden ventanas planoparalelas. En el caso de radiación fluorescente como radiación dispersa, las ventanas presentan, para la reducción adicional de pérdidas de radiación, una capa dicroica que transmite la radiación de excitación (del haz 38 en forma de aguja) y que refleja la radiación fluorescente, o están compuestas de un cristal (con tales propiedades) de doble refracción planoparalelo. En la cuarta realización con la caja de espejos, las aberturas 270, 274 son escotaduras de paso de la caja de espejos.

La superficie 272 de fondo es transparente para la radiación 64 dispersa. En el caso del cuerpo base de vidrio, la superficie 272 de fondo no está revestida. En el caso del cuerpo base metálico, la superficie 272 de fondo comprende una ventana planoparalela. En la cuarta realización con la caja de espejos, la caja de espejos está abierta en la superficie 272 de fondo.

La quinta realización del recipiente 256 de muestras mostrada en la Fig. 2 para radiación fluorescente como radiación dispersa, comprende un cuerpo base transparente, que en las superficies laterales presenta una capa dicroica. Alternativa o adicionalmente, las superficies laterales del recipiente de muestras están compuestas por un filtro dicroico o un filtro de interferencia. De esta manera, las superficies laterales del recipiente 256 de muestras están configuradas para transmitir la radiación de excitación (del haz 38 en forma de aguja) y reflejar la radiación fluorescente. De esta manera, es detectable una proporción de la radiación 64 dispersa de aproximadamente el 50 % o más. Con respecto a la radiación fluorescente (es decir, la radiación 64 dispersa), las superficies laterales funcionan como superficie 269 de reflexión. Dado que las superficies laterales, con respecto a la radiación de excitación (del haz 38 en forma de aguja), son transparentes, las superficies laterales posibilitan, además, la entrada y la salida del haz 38 en forma de aguja. Es decir, todas las superficies laterales están a disposición como abertura 270 de iluminación o abertura 274 de transmisión. El elemento 30 de regulación está configurado para la reticulación (es decir, desplazamiento) del haz en forma de aguja en la dirección-x y la dirección-y. Sin pérdidas de radiación, se puede renunciar a ventanas (en particular, ranuras). No es necesaria una desplazabilidad del soporte 14 de muestras en dirección-y.

En todas las realizaciones del recipiente 256 de muestras, mediante reflexión (o reflexión total) de la radiación 64 dispersa en la superficie 269 de reflexión, se conduce la radiación 64 dispersa hacia la superficie 272 de fondo. Para la detección integral de la radiación 64 dispersa, se detecta una proporción de la radiación dispersa que sale a través de la superficie 272 de fondo. La superficie 272 de fondo corresponde (funcionalmente) a la abertura 72 de medición. La proporción de la radiación dispersa de la radiación dispersa total que sale a través de la superficie 272 de fondo es determinable, como se ha descrito anteriormente en relación con la abertura 72 de medición. Además, la proporción de la radiación dispersa que sale a través de la superficie 272 de fondo, es determinable mediante un ángulo de reflexión, bajo el que la radiación dispersa se refleja por la superficie 269 de reflexión. Siempre que la reflexión en las superficies 269 de reflexión comprenda reflexión total (como en la primera y quinta realización del recipiente 256 de muestras), el ángulo de reflexión para la determinación de proporción es un ángulo de reflexión total en la superficie 269 de reflexión.

La Fig. 2b muestra, además, una segunda unidad 16' de detector opcional, que, a continuación, está descrita detallada en relación con un cuarto ejemplo de realización de un dispositivo 410. Para la ampliación del ángulo sólido detectado, las unidades 16, 16' de detector de los diferentes ejemplos de realización son combinables.

Para (con cada una de las realizaciones del recipiente 256 de muestras) desacoplar más del 12,5 % de la radiación dispersa del recipiente 256 de muestras, el primer colimador 76 del colector 266 de radiación dispersa está en

contacto óptico (adaptado al índice de refracción) directo con la superficie 272 de fondo. Como se ha descrito anteriormente, el primer colimador 76 comprende, del lado de la muestra, un conductor 76a de luz que se estrecha.

5 Todas las demás características del segundo ejemplo de realización corresponden a aquellas del primer ejemplo de realización. En particular, los correspondientes subgrupos 12, 14, 16 y sus elementos funcionales poseen los mismos grados de libertad.

10 Los siguientes procedimientos son realizables con el dispositivo 210 descrito: FLIM (“Fluorescence Lifetime Microscopy”); MPM (Multi-Photonen Microscopy); FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”); FRAP (“Fluorescence Recovery after Photobleaching”); STED (“Stimulated Emission Depletion”), radiándose, después del haz 38 en forma de aguja, como haz de excitación un “haz de tubos” como haz de desconexión con distribución de intensidad esencialmente cilíndrica; FLIP (“Fluorescence Loss in Photobleaching”); denominada “Superresolution Microscopy”; microscopía de luz dispersa; eventualmente también pueden ser realizables: STORM (“Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”) y FCS (“Fluorescence Correlation Spectroscopy”).

15 La Fig.3 muestra un tercer ejemplo de realización de un dispositivo 310 para la detección de imágenes tomográfica. Para elementos funcionales del tercer ejemplo de realización con el mismo símbolo de referencia que en el primer o segundo ejemplo de realización es válido, en particular, con respecto a sus propiedades, naturaleza, función y su cooperación, lo correspondiente descrito anteriormente.

20 El tercer ejemplo de realización se diferencia de uno de los ejemplos de realización anteriores, dado que la radiación 64 dispersa se recolecta (es decir, se integra) directamente con un primer colimador. Con otras palabras: para la detección integral de la radiación 64 dispersa, un colector 366 de radiación dispersa no comprende un conductor 76a de luz. El colector 366 de radiación dispersa comprende, como primer colimador, una lente 76b, como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, el colector 366 de radiación dispersa comprende un reflector 390. El soporte 14 de muestras y el recipiente 56 de muestras están dispuestos entre el reflector 390 y la lente 76b. El soporte 14 de muestras, más concretamente, el eje de giro, se encuentra en el plano focal de la lente 76b. Como reflector 390, se utiliza un espejo cóncavo esférico o una pluralidad de retrorreflectores (también denominada “ojo de gato”). El último caso, el dispositivo 310 es particularmente fácil de ajustar. En el caso del espejo cóncavo esférico, un punto central de la esfera se encuentra en el soporte 14 de muestras, más concretamente, en el eje de giro. De esta manera, el reflector 390 (en ambos casos) refleja la radiación 64 dispersa capturada en el ángulo sólido del reflector 390 a su origen. De esta manera, son detectables hasta el doble de fotones de la radiación 64 dispersa. Para una forma de realización, en la que la radiación 64 dispersa reflejada (como haz de rayos casi paralelo) pasa por delante del recipiente 56 de muestras, se hace referencia al ejemplo de realización del dispositivo 510 descrito a continuación.

25 Alternativamente, para un aumento de la sensibilidad o bien reducción de la intensidad comparable del haz 38 en forma de aguja radiado, en lugar de un reflector 390, también pueden estar dispuestos dos o más segmentos de reflector en torno al soporte 14 de muestras.

35 Todas las otras características del tercer ejemplo de realización corresponden a aquellas del primer o segundo ejemplo de realización. En particular, los correspondientes subgrupos 12, 14, 16 y sus elementos funcionales poseen los mismos grados de libertad.

40 Los siguientes procedimientos son realizables con el dispositivo 310 descrito: FLIM (“Fluorescence Lifetime Microscopy”); MPM (Multi-Photonen Microscopy); FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”); FRAP (“Fluorescence Recovery after Photobleaching”); STED (“Stimulated Emission Depletion”), radiándose, después del haz 38 en forma de aguja, como haz de excitación un “haz de tubos” como haz de desconexión con distribución de intensidad esencialmente cilíndrica; FLIP (“Fluorescence Loss in Photobleaching”); denominada “Superresolution Microscopy”; microscopía de luz dispersa; eventualmente también pueden ser realizables: STORM (“Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”) y FCS (“Fluorescence Correlation Spectroscopy”).

45 La Fig. 4 muestra un cuarto ejemplo de realización de un dispositivo 410 para la detección de imágenes tomográfica. Para elementos funcionales del cuarto ejemplo de realización con el mismo símbolo de referencia que en los ejemplos de realización anteriores, es válido, en particular, con respecto a sus propiedades, naturaleza, función y su cooperación, lo correspondiente descrito anteriormente.

50 El cuarto ejemplo de realización se diferencia de uno de los ejemplos de realización anteriores, dado que (en lugar de un colector 66; 266; 366 de radiación dispersa) están dispuestos dos o más colectores 366, 366' (o, también, 66; 266) de radiación dispersa en torno al soporte 14 de muestras. Con otras palabras: la unidad 16 de detector comprende dos o más colectores 366, 366' (o, también, 66; 266) de radiación dispersa.

55 En ejemplos de realización (no mostrados), con un único emisor 86 de señales, están dispuestos prismas o espejos para concentrar diferentes caminos del haz de la radiación 78, 78' dispersa colimada de cada uno de los dos o más colectores 366, 366' de radiación dispersa. La radiación dispersa colimada concentrada, se proyecta entonces, como se ha descrito anteriormente, sobre el único emisor 86 de señales para la ampliación de un ángulo sólido detectado.

En el ejemplo de realización mostrado en la Fig. 4, está dispuesta, respectivamente, una unidad 80; 80' de selección de filtro, un segundo colimador 84, 84' y un emisor 86; 86' de señales en asociación con cada uno de los dos o más

colectores 366, 366' (o, también, 66; 266) de radiación dispersa. En una variante, una selección de filtro común está sincronizada por medio de las unidades 80, 80' de selección de filtro, y señales parciales de los emisores 86, 86' de señales se totalizan a una señal para la ampliación del ángulo sólido detectado. En una variante alternativa, la selección de filtro, por medio de las unidades 80, 80' de selección de filtro, es independiente y las dos o más señales de los emisores 86, 86' de señales se detectan de manera síncrona. De esta manera, son detectables simultáneamente varias señales, que corresponden a diferentes componentes de color en la radiación 64, 64' dispersa. Esto posibilita, en particular, en el caso de radiación fluorescente, una rápida detección (y reconstrucción) de imágenes de color marcadas funcionales.

Todas las demás características del cuarto ejemplo de realización corresponden a aquellas de los ejemplos de realización anteriores. En particular, los correspondientes subgrupos 12, 14, 16 y sus elementos funcionales poseen los mismos grados de libertad.

Los siguiente procedimientos son realizables con el dispositivo 410 descrito: FLIM ("Fluorescence Lifetime Microscopy"); MPM (Multi-Photonen Microscopy); FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer"); FRAP ("Fluorescence Recovery after Photobleaching"); STED ("Stimulated Emission Depletion"), radiándose, después del haz 38 en forma de aguja, como haz de excitación un "haz de tubos" como haz de desconexión con distribución de intensidad esencialmente cilíndrica; FLIP ("Fluorescence Loss in Photobleaching"); denominada "Superresolution Microscopy"; microscopia de luz dispersa; eventualmente también pueden ser realizables: STORM ("Stochastic Optical Reconstruction Microscopy") y FCS ("Fluorescence Correlation Spectroscopy").

La Fig. 5 muestra un quinto ejemplo de realización de un dispositivo 510 para la detección de imágenes tomográfica. Para elementos funcionales del quinto ejemplo de realización con el mismo símbolo de referencia que en los ejemplos de realización anteriores, es válido, en particular, con respecto a sus propiedades, naturaleza, función y su cooperación, lo correspondiente descrito anteriormente.

El quinto ejemplo de realización se diferencia de uno de los ejemplos de realización anteriores, dado que la radiación 64 dispersa se crea directamente en el primer colimador 76, en particular, en uno de sus elementos 76a, 76b funcionales. Con otras palabras: el primer colimador 76 comprende (funcionalmente) el recipiente 56 de muestras.

En el ejemplo de realización mostrado en la Fig. 5, un primer colimador 576 comprende un cuerpo 576a de vidrio con (aproximadamente) la forma de un elipsoide semirotatorio alargado. El primer colimador 576 presenta, en su extremo redondeado, un reflector 590 a través de aproximadamente un tercio de su longitud axial. El reflector 590 es realizable como revestimiento reflectante sobre el cuerpo 576a de vidrio, o comprende la pluralidad de retrorreflectores (descritos en relación con el reflector 390).

Todavía dentro de ese tercio, aproximadamente con un cuarto de la longitud axial, está prevista una escotadura 556 del colimador cuadrada alargada. El eje longitudinal de la escotadura 556 del colimador coincide con el eje de giro (vertical) del dispositivo 510 y corta perpendicular el eje 594 de simetría del primer colimador 576. La escotadura 556 del colimador se extiende casi por completo a través de la sección transversal del primer colimador 576, de modo que la escotadura 556 del colimador está cerrada de un lado (abajo). La escotadura 556 del colimador está dimensionada, de modo que el soporte 14 de muestras dispuesto (a través de una longitud que envuelve la muestra) en la escotadura 556 del colimador, es rotatorio sin contacto. De esta manera, la escotadura 556 del colimador funciona como recipiente 56 de muestras, como se ha descrito anteriormente. En particular, el volumen entre el soporte 14 de muestras y la escotadura 556 del colimador incluye el líquido 58 adaptado al índice de refracción.

Siempre que una escotadura 556 del colimador no cuadrada no presente ya superficies laterales planas para la entrada y la salida del haz 38 en forma de aguja, están previstas correspondientes ventanas planas en las superficies laterales. Mediante la ventana de entrada plana, el haz 38 en forma de aguja se focaliza en el soporte de muestras.

En el extremo del primero colimador 576 opuesto al reflector 590, en una escotadura cónica, está dispuesta una lente 576b sobre el eje 594 de simetría. La lente 576b está configurada similar a la lente 76b descrita anteriormente.

Los elementos 576a, 590 y 576b ópticos están dispuestos para desviar, prácticamente, toda la radiación 64 dispersa que sale del soporte 14 de muestras, con una divergencia residual reducida en dirección del emisor 86 de señales de la unidad 16 de detector. La radiación dispersa reflejada a través del reflector 590 en el soporte 14 de muestras, junto con la radiación 64 dispersa detectada directamente, se coliman mediante el primer colimador 576, tanto que la radiación detectada, como se ha descrito anteriormente, se puede filtrar y detectar.

Todas las demás características del quinto ejemplo de realización corresponden a aquellas de los ejemplos de realización anteriores. En particular, los correspondientes subgrupos 12, 14, 16 y sus elementos funcionales poseen los mismos grados de libertad.

Los siguiente procedimientos son realizables con el dispositivo 510 descrito: FLIM ("Fluorescence Lifetime Microscopy"); MPM (Multi-Photonen Microscopy); FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer"); FRAP ("Fluorescence Recovery after Photobleaching"); STED ("Stimulated Emission Depletion"), radiándose, después del haz 38 en forma de aguja, como haz de excitación un "haz de tubos" como haz de desconexión con distribución de

intensidad esencialmente cilindrosimétrica; FLIP (“Fluorescence Loss in Photobleaching”); denominada “Superresolution Microscopy”; microscopia de luz dispersa; eventualmente también pueden ser realizables: STORM (“Stochastic Optical Reconstruction Microscopy”) y FCS (“Fluorescence Correlation Spectroscopy”).

5 En todos los ejemplos de realización con solo un elemento 42 de regulación-x, una superficie fotosensible del emisor 86 de señales es considerablemente reducible (en la dirección-y). Como se ha descrito anteriormente, esto también es posible con desplazamiento-y variable, mediante un procedimiento síncrono en dirección-y, bien, de soporte 14 de muestras y recipiente 56; 256 de muestras, o de fuente 12 de luz y unidad 16 de detector.

10 La Fig. 6 muestra un diagrama de flujo simplificado de un procedimiento 600 para la detección de imágenes tomográfica. El procedimiento 600 es realizable por medio de cada uno de los ejemplos de realización descritos anteriormente del dispositivo 10; 210; 310; 410; 510 para la detección de imágenes tomográfica.

El procedimiento 600 para la detección de imágenes tomográfica comprende los pasos:

- radiar 602 un haz 38 en forma de aguja con una dirección 40 del haz en un soporte 14 de muestras (giratorio) para la excitación de radiación 64 dispersa,
- 15 - detección 604 sin resolución local de la radiación 64 dispersa excitada a lo largo de una sección del haz 38 en forma de aguja,
- desplazar 606 esencialmente paralelo el haz 38 en forma de aguja transversal con respecto a la dirección 40 del haz 38 en forma de aguja a una pluralidad de posiciones de medición con una dirección reticulada rápida y una dirección reticulada lenta,
- 20 - giro 608 del soporte 14 de muestras a una pluralidad de posiciones de giro para cada una de la pluralidad de posiciones de medición y
- reconstruir 610 tomográficamente una imagen (en particular, una imagen seccional o una imagen espacial) en base a (una intensidad de) la radiación 64 dispersa detectada.

25 La dirección reticulada rápida está, preferiblemente, perpendicular sobre la dirección reticulada lenta. La dirección reticulada lenta puede coincidir con el eje de giro. En relación con uno de los dispositivos descritos anteriormente, la dirección-x puede ser la dirección reticulada rápida y/o la dirección-y puede ser la dirección reticulada lenta. El desplazamiento a las posiciones de medición también se denomina reticular. El desplazamiento puede tener lugar por medio del elemento 30 de regulación óptico descrito anteriormente. El haz 38 en forma de aguja puede desplazarse en un plano-xy (perpendicular con respecto a la dirección 40 del haz) correspondiente a un recorrido de meandro. Alternativamente, el desplazamiento puede presentar un recorrido en forma de espiral o tener lugar a lo largo de círculos concéntricos.

30 La dirección reticulada lenta y el giro son intercambiables en el procedimiento 600. Es decir, conmutar (al menos) el movimiento de la dirección reticulada lenta y el giro. Esto puede posibilitar una minimización del tiempo de detección total.

35 Siempre que el eje de giro esté paralelo con respecto a la dirección-y, la reconstrucción puede comenzar ya antes de la finalización de una detección de imagen completa. Preferiblemente, después de completarse una detección parcial con respecto a la dirección reticulada rápida y al giro (es decir, cuando el giro tiene lugar “antes” de la dirección reticulada lenta), se reconstruye un plano de sección (perpendicular con respecto a la dirección reticulada lenta). De esta manera, después de cada giro completo puede comenzar una reconstrucción parcial.

40 Un procedimiento de control (para la detección de la radiación 64 dispersa), puede comprender el desplazamiento en la dirección reticulada rápida como “bucle iterativo más interior”, el giro como “bucle iterativo del medio” y el desplazamiento en la dirección reticulada lenta como “bucle iterativo exterior”. La reconstrucción parcial puede comenzar tras finalizar cada uno de los “bucles iterativos del medio”. Cada una de las reconstrucciones parciales es realizable independiente de otra detección parcial e independiente de otra reconstrucción parcial. De esta manera, las reconstrucciones parciales se pueden paralelizar de manera eficaz.

45 Como se ha hecho evidente a partir de la descripción de los diferentes ejemplos de realización, el dispositivo 10; 210; 310; 410; 510 y el procedimiento 600 posibilitan una detección de imágenes tomográfica de una muestra al menos parcialmente transparente, que está suspendida en una sustancia que compensa el índice de refracción. La fuente 18 de radiación también puede comprender varios láser, cuyos haces en bruto parciales están superpuestos al haz 20 en bruto. De esta manera, es realizable un espectro del haz 38 en forma de aguja, que está adaptado a varias transiciones de los fluoróforos (es decir, varios colores) incorporados en la muestra.

50 La técnica descrita puede, según cada ejemplo de realización, ofrecer una o varias de las siguientes ventajas: se evitan artefactos anulares, como pueden aparecer en tomografía de proyección óptica (OPT). La sensibilidad de la fluorescencia (en muestras con una dimensión de más de un milímetro) es significativamente mayor que en técnicas conocidas. Por lo tanto, también es posible un rendimiento de muestras más alto, o bien, existe un potencial de

deterioración más reducido para la muestra. El dispositivo 10; 210; 310; 410; 510 requiere solo elementos funcionales disponibles económicos.

Lista de símbolos de referencia

(Las últimas dos cifras se refieren a la característica funcional. En caso de símbolos de referencia de tres cifras, la cifra líder corresponde a la figura.)

5	10, 210, 310, 410, 510	dispositivo para la detección de imágenes tomográfica
	12	fuentes de luz
	14	soporte de muestras
	16	unidad de detector
10	18	fuentes de radiación
	20	haz en bruto
	22	óptica de conformación de haces
	24	óptica de telescopio
	26	filtros y máscaras de fase
15	28	haz conformado
	30	elemento de regulación óptico
	32	divisor del haz
	34	haz parcial
	36	detector de referencia
20	38	haz en forma de aguja
	40	dirección del haz
	42	elemento de regulación-x
	44	actuador-x
	46	espejo reticulado-x
25	48	elemento de regulación-y
	50	actuador-y
	52	espejo reticulado-y
	54	(primera) óptica de focalización
	56, 256; 556	recipiente de muestras, escotadura del colimador
30	58	líquido
	59	superficie de vidrio
	60	segunda óptica de focalización
	62	fotodetector de transmisión
	64, 64'	radiación dispersa
35	66, 266, 366, 366'	colector de radiación dispersa
	68	integrador
	69; 269	superficie interior; superficie de reflexión

ES 2 768 075 T3

	70, 270	abertura de iluminación
	72; 272	abertura de medición; abertura de fondo transparente
	74, 274	abertura de transmisión
	76, 576	primer colimador
5	576a	cuerpo de vidrio
	76a, 576a	conductor de luz, en particular, guía de onda de luz
	76b, 576b	lente
	78'	radiación dispersa parcialmente colimada
	78	radiación dispersa colimada
10	80, 80'	unidad de selección de filtro
	82	radiación dispersa filtrada
	84	segundo colimador
	86; 86'	emisor de señales
	88	motor paso a paso
15	390, 590	reflector
	594	eje de simetría

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (10; 210; 310; 410; 510) para la detección de imágenes tomográfica, que comprende:
 - un soporte (14) de muestras,
 - una fuente (12) de luz, que está configurada para la generación de un haz (38) en forma de aguja que atraviesa con una dirección (40) del haz un volumen de muestra del soporte (14) de muestras previsto para la aceptación de una muestra, y que presenta un elemento (30) de regulación óptico, que es capaz de desplazar el haz (38) en forma de aguja, que atraviesa el volumen de muestra del soporte (14) de muestras, transversal con respecto a la dirección (40) del haz, con dirección (40) del haz esencialmente inalterada y
 - una unidad (16) de detector, que está configurada para la detección sin resolución local de al menos una proporción de una radiación (64, 64') dispersa que se escapa de una sección del haz (38) en forma de aguja dentro del volumen de muestra del soporte (14) de muestras, comprendiendo la radiación (64, 64') dispersa, radiación dispersa que se dispersa fuera de la dirección del haz, caracterizado por que la unidad (16) de detector presenta al menos un colector (66; 266; 366; 366') de radiación dispersa que está configurado, o que juntos están configurados, para detectar integralmente la radiación (64, 64') dispersa en un ángulo sólido en torno al volumen de muestra o del soporte (14) de muestras de al menos $0,12 \pi$ sr.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, atravesando el haz en forma de aguja el soporte de muestras y/o la muestra.
3. Dispositivo según la reivindicación 1 o 2, siendo el soporte (14) de muestras y la fuente (12) de luz giratorios uno con respecto al otro en torno a un eje de giro, siendo la dirección (40) del haz esencialmente perpendicular con respecto al eje de giro.
4. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, presentando el haz (38) en forma de aguja un tamaño de haz dentro del volumen de muestra o del soporte (14) de muestras con una longitud de Rayleigh que es esencialmente igual o mayor que la mitad de la longitud de la sección detectada.
5. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la sección detectada el haz (38) en forma de aguja completo que atraviesa el volumen de muestra o el soporte (14) de muestras.
6. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, siendo la radiación (64; 64') dispersa una radiación dispersa de Raman, preferiblemente, una dispersión de Stokes-Raman, o radiación fluorescente, preferiblemente, de una fluorescencia no resonante, excitada mediante el haz (38) en forma de aguja.
7. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando la fuente (12) de luz configurada, además, para generar el haz (38) en forma de aguja en el espectro visible, en el espectro ultravioleta o en el espectro infrarrojo.
8. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando la fuente (12) de luz configurada, además, para generar el haz (38) en forma de aguja en pulsos intensivos para la excitación de varios fotones.
9. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, estando la fuente (12) de luz configurada, además, para generar el haz (38) en forma de aguja con una gama limitada, preferiblemente, mediante radiación láser monocromática.
10. Dispositivo según la reivindicación 9, estando la unidad (16) de detector configurada, además, para detectar la radiación (64; 64') dispersa esencialmente solo en una longitud de onda o un rango de longitudes de onda fuera de la gama limitada.
11. Dispositivo según una de las reivindicaciones anteriores, presentando la unidad de detector un emisor (86; 86') de señales con un detector semiconductor o un multiplicador de fotoelectrones, y comprendiendo el colector (66; 266; 366; 366') de radiación dispersa un primer colimador (76), que está dispuesto entre el volumen de muestra o el soporte (14) de muestras y el emisor (86; 86') de señales.
12. Dispositivo según una de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende, además, un primer colimador (576), presentando el primer colimador (576) como recipiente (56; 256; 556) de muestras, una escotadura (556) del colimador que corta su eje óptico.
13. Dispositivo según la reivindicación 12, comprendiendo el primer colimador (576) un reflector (590), preferiblemente, un espejo cóncavo o una pluralidad de retroreflectores, que está configurado para reflejar una parte de la radiación (64; 64') en el volumen de muestra o el soporte (14) de muestras.
14. Procedimiento (600) para la detección de imágenes tomográfica, que comprende:
 - radiación (602) de un haz (38) en forma de aguja con una dirección (40) del haz en un volumen de muestra, previsto para la aceptación de una muestra, de un soporte (14) de muestras para la excitación de radiación (64; 64') dispersa,

- detección (604) sin resolución local de la radiación (64; 64') dispersa excitada a lo largo de una sección del haz (38) en forma de aguja, comprendiendo la radiación (64; 64') dispersa, radiación dispersa dispersada fuera de la dirección del haz, detectándose integralmente la radiación (64; 64') dispersa en un ángulo sólido en torno al volumen de muestra o al soporte (14) de muestras de al menos $0,12 \pi$ sr,

5 - desplazamiento (606) esencialmente paralelo del haz (38) en forma de aguja, transversal con respecto a la dirección (40) del haz (38) en forma de aguja a una pluralidad de posiciones de medición, presentando el desplazamiento una dirección reticulada rápida y una dirección reticulada lenta,

- giro (608) del soporte (14) de muestras a una pluralidad de posiciones de giro y

- reconstrucción (610) tomográfica de una imagen en base a la radiación (64; 64') dispersa detectada.

10

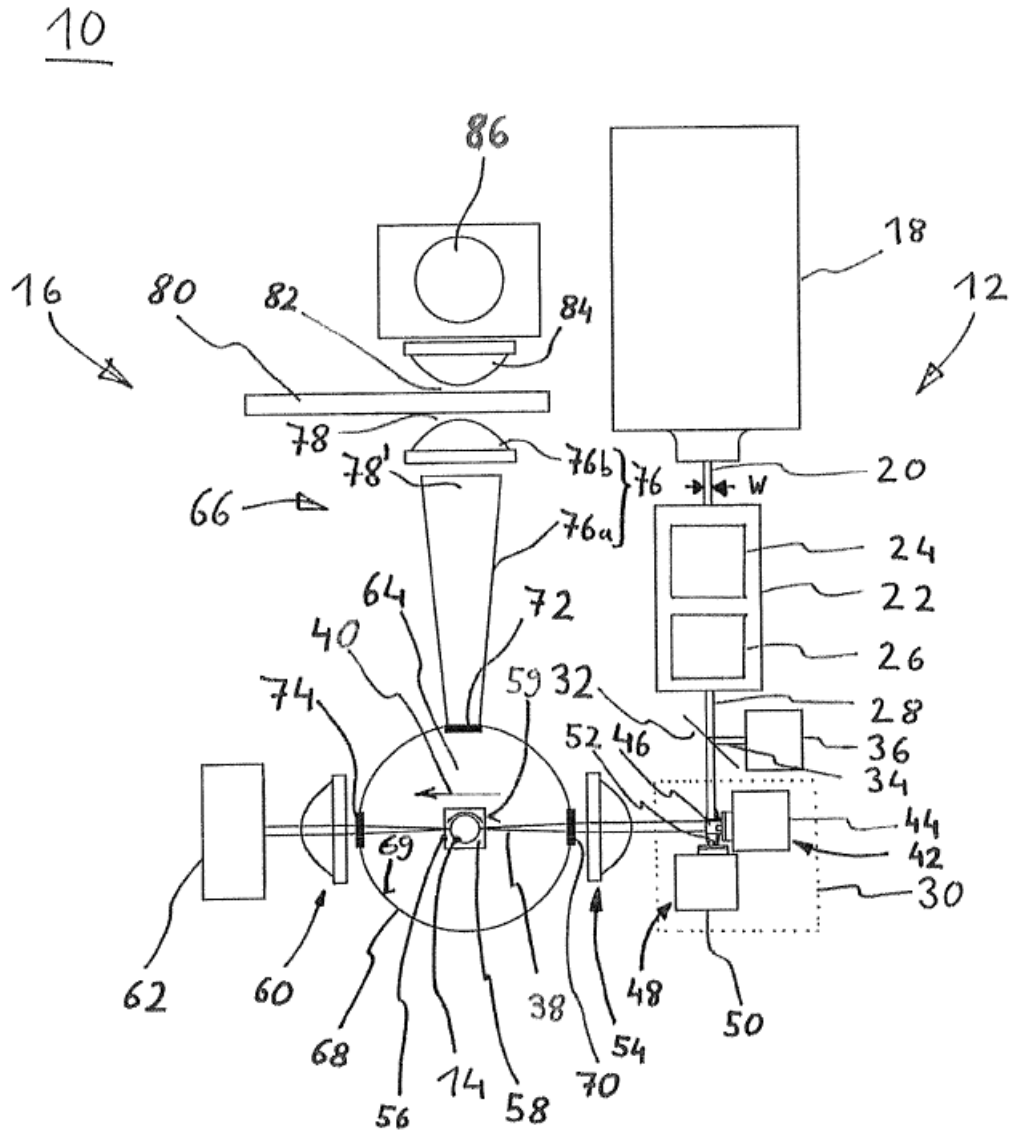
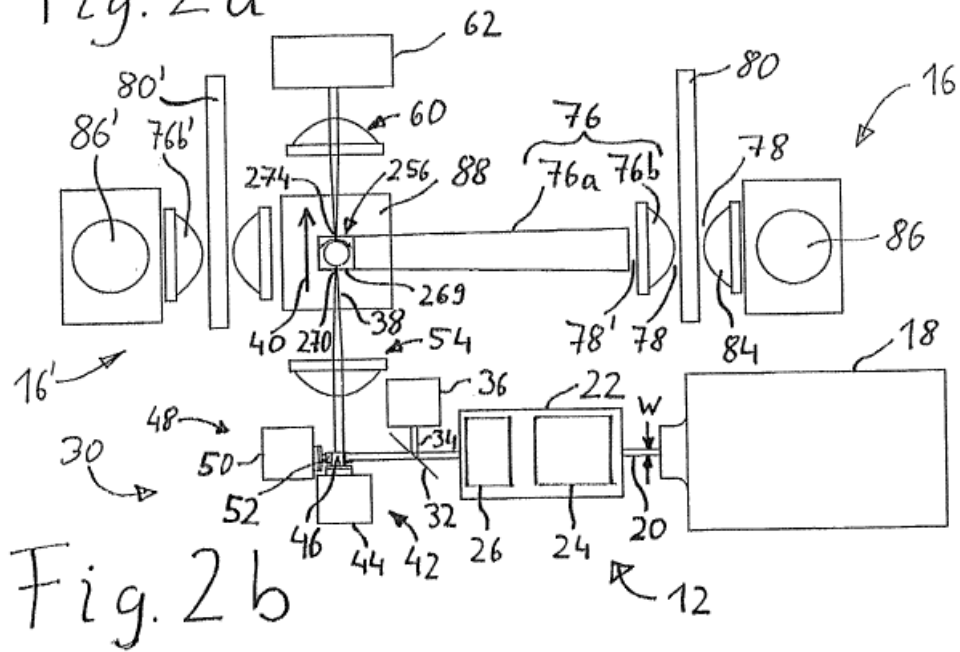
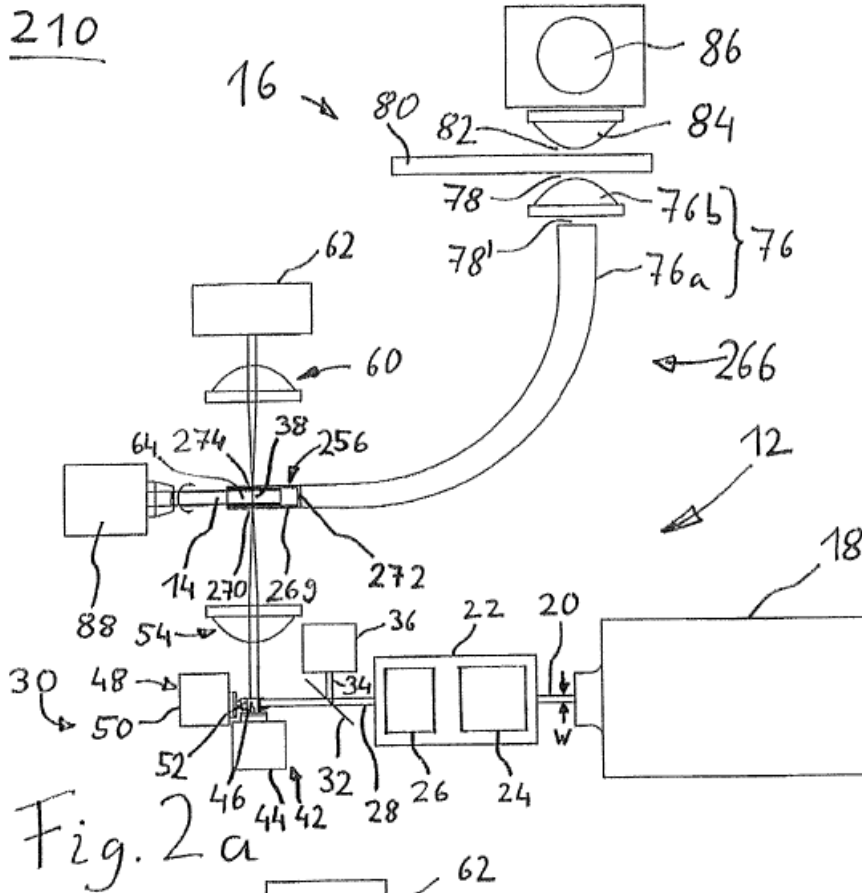


Fig. 1



310

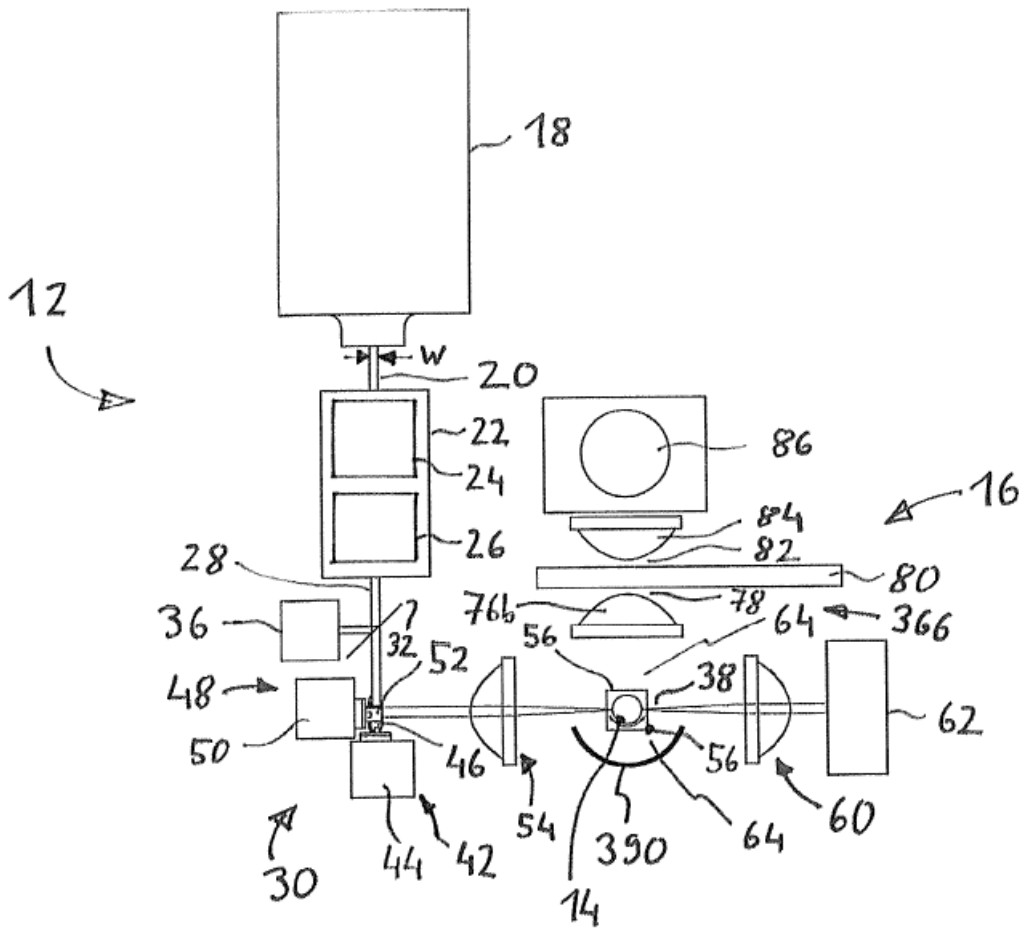


Fig. 3

410

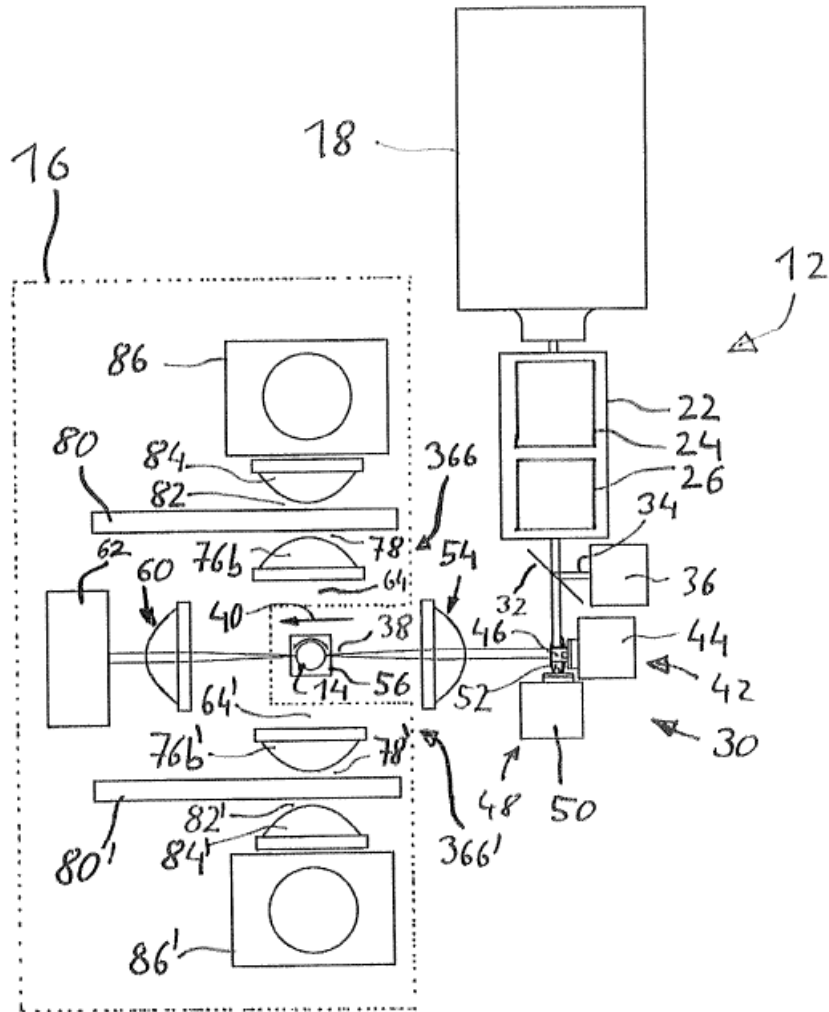


Fig. 4

510

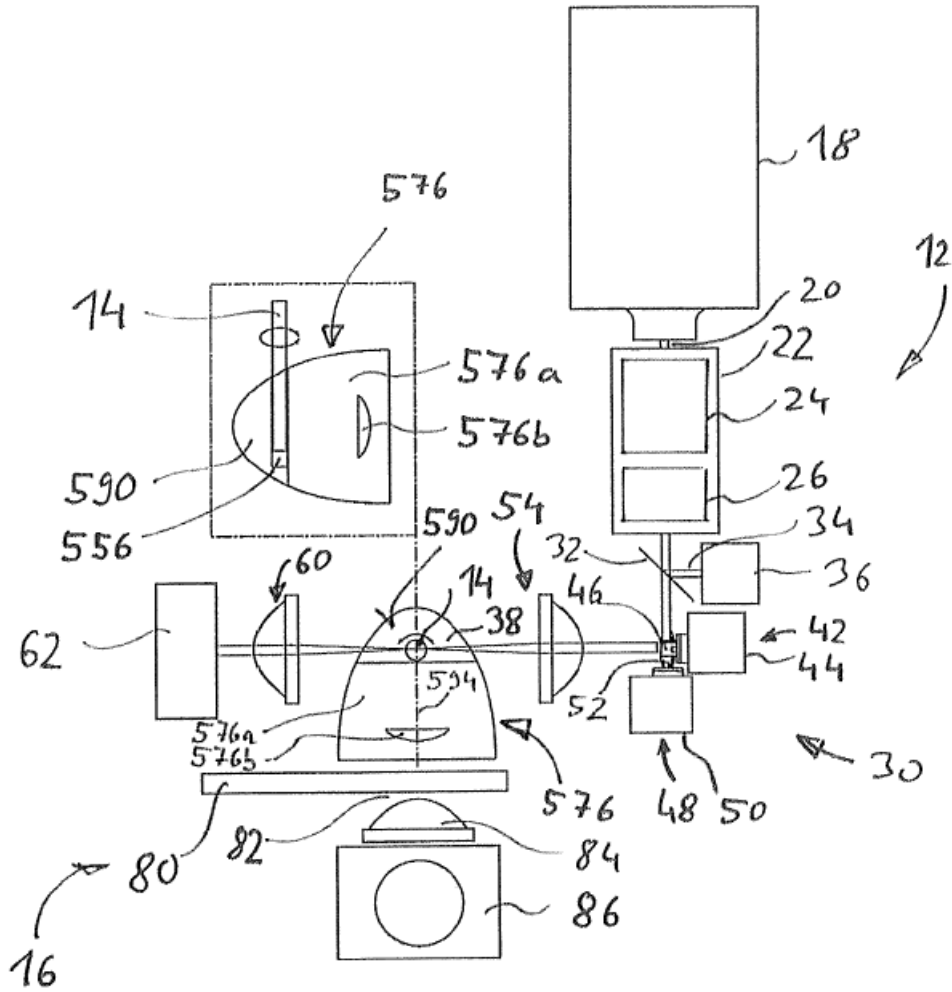


Fig. 5

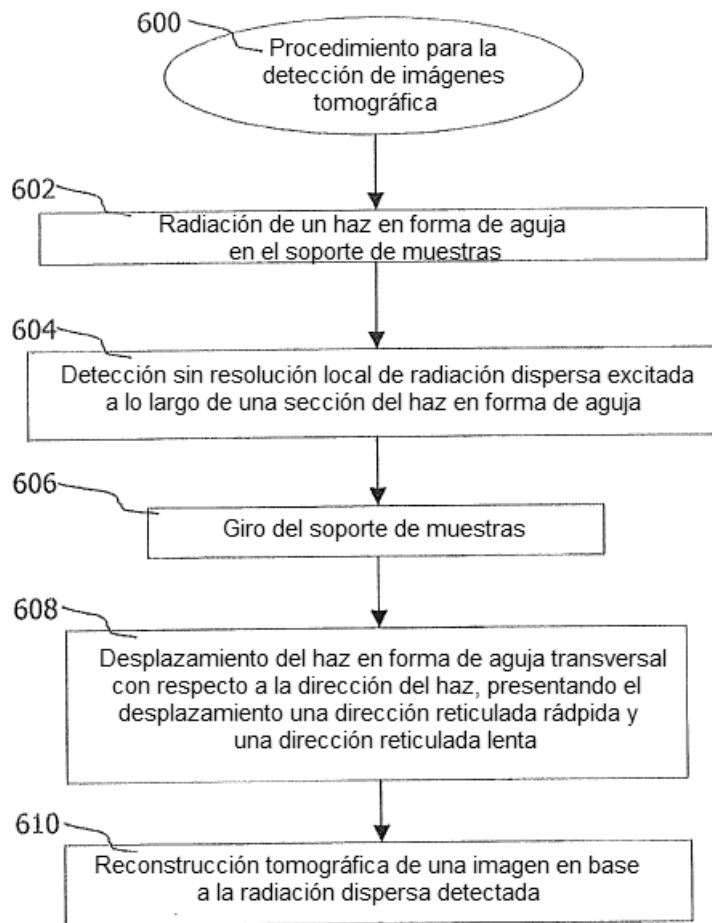


Fig. 6