

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 220**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
A61B 1/04 (2006.01)
A61B 1/06 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)
G01J 3/10 (2006.01)
G01J 3/32 (2006.01)
G01J 3/44 (2006.01)
G01N 21/80 (2006.01)
G01N 21/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/EP2015/062447**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185661**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15725386 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021 EP 3152548**

54 Título: **Métodos y medios de formación de imágenes multiespectrales**

30 Prioridad:

05.06.2014 EP 14171378
24.03.2015 EP 15160630

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE

72 Inventor/es:

DIMITRIADIS, NIKOLAS y
DELIOLANIS, NIKOLAOS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 883 220 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

Métodos y medios de formación de imágenes multiespectrales

La presente invención se refiere a la formación de imágenes multiespectrales de muestras, en particular de tejidos biológicos.

5 Cuando se forman imágenes de tejido, la luz de iluminación puede ser absorbida o dispersada. Si el tejido contiene moléculas de fluorescencia, entonces la energía absorbida se almacena temporalmente colocando las moléculas en un estado excitado y luego se libera parcialmente como fotón de longitud de onda más larga. La intensidad de la luz emitida como fluorescencia suele ser muchos órdenes de magnitud más débil que la intensidad de la luz de excitación que se ha reflejado y, por tanto, es necesario separar o bloquear la luz reflejada de la luz emitida.

10 La manera más práctica es usar filtros de paso de banda en las rutas de excitación y emisión de los haces para limitar el rango espectral de las luces y evitar el traspaso de la excitación reflejada en la ruta de emisión registrada. Una consecuencia directa de este método es que no es posible adquirir la imagen de fluorescencia simultáneamente con la imagen de excitación reflejada en la misma ruta de detección.

15 Para adquirir tanto la fluorescencia como las imágenes reflejadas es necesario cambiar entre los dos modos de adquisición: con y sin filtros. Para un objeto estático, es decir, para un objeto que no se mueve significativamente durante la adquisición de las imágenes de fluorescencia y reflectancia, nunca es un problema cambiar entre filtros y adquirir las dos imágenes secuencialmente. Sin embargo, si los objetos en el campo de visión se mueven, entonces las imágenes registradas no coinciden y el alineamiento puede ser muy difícil incluso después de un procesamiento intensivo de imágenes.

20 Sin embargo, otro problema que puede surgir es la formación de imágenes simultáneas de múltiples agentes fluorescentes que tienen diferentes características de excitación y emisión. En este caso, se deben utilizar diferentes conjuntos de filtros de imágenes para excitación y emisión para formar imágenes de los diferentes fluorocromos, lo que eventualmente aumenta la complejidad y el número de imágenes adquiridas. Además, cuando se forman imágenes de objetos en movimiento, es necesario registrar tanto la fluorescencia emitida como la excitación reflejada
25 de un objeto con tasas de fotogramas de vídeo bastante elevadas. Entonces, el cambio entre filtros debe conseguirse muy rápido.

Hay varios enfoques que se utilizan para formar imágenes multiespectrales. Se pueden caracterizar a grandes rasgos por a) el número de sensores utilizados, b) el uso de filtros de conmutación, c) el cambio entre diferentes iluminaciones o, d) el uso de filtros de paso de banda múltiple, el uso de divisores de haz, etc. [el documento de Y. Garini, I. T. Young
30 y G. McNamara, "Spectral imaging: Principles and applications," Citometría Parte A 69A, 735-747 (2006)]

Estas técnicas de la técnica anterior se describirán en detalle a continuación.

El documento US 2003/0191368 A1 describe un sistema de formación de imágenes de endoscopio por fluorescencia. El sistema utiliza fuentes de luz primera y segunda para proporcionar imágenes de fluorescencia y reflectancia de las fuentes para proporcionar imágenes de fluorescencia y reflectancia del tejido que se está examinando. Se utiliza un
35 dispositivo de formación de imágenes montado en el extremo distal del dispositivo para recopilar ambas imágenes.

El documento WO 2009/021079 A1 describe una construcción única para diodos emisores de luz (leds) con al menos una barra luminiscente y elementos ópticos extractores utilizados para generar una variedad de fuentes de luz de alto brillo con diferentes espectros de emisión.

40 El documento JP 2002 287034 A describe un microscopio óptico de barrido que aplica secuencialmente tres haces de excitación a una superficie de muestra y detecta la fluorescencia excitada por estos haces con un fotomultiplicador.

[cambio de filtros]

Algunos sistemas de formación de imágenes multiespectrales tienen un solo sensor de imagen e implementan un mecanismo de cambio rápido entre el modo de formación de imágenes de reflectancia y fluorescencia. Esto se puede lograr con el uso de conjuntos de filtros de emisión y excitación de paso de banda que se montan en ruedas de filtros
45 o cubos de filtros que se intercambian rápidamente para registrar imágenes de reflectancia y fluorescencia alternadamente con alta frecuencia. Este enfoque es sencillo y permite el mayor rendimiento de luz, pero requiere piezas mecánicamente móviles como ruedas de filtro. Además, dependiendo de la configuración del filtro, permite el registro de la intensidad de un solo fluoróforo a la vez. Cambiar los filtros a frecuencias cercanas a la velocidad de vídeo es técnicamente complejo y requiere una sincronización mecánica precisa con la secuencia de captura de
50 fotogramas de la cámara.

Para evitar componentes mecánicos, se pueden utilizar filtros sintonizables espectralmente, por ejemplo filtros sintonizables de cristal líquido. El cambio entre configuraciones espectrales adecuadas para diferentes fluoróforos puede ser muy rápido (<1 ms), sin embargo, el rendimiento de transmisión de los filtros sintonizables es limitado. Además, son muy sensibles a los ángulos de transmisión de luz y a la polarización de la luz, y se asocian a costes

bastante elevados.

[divisores de haz]

Un enfoque alternativo para la formación de imágenes multiespectrales es utilizar varios sensores, donde delante de cada sensor se coloca un filtro de emisión correspondiente. La luz puede llegar a cada sensor pasando a través de una sola lente de objetivo y usando una disposición de divisor de haz óptico para entregar la luz a cada sensor, o cada sensor puede tener una lente de objetivo separada. En cualquier caso, cada sensor se empareja con un filtro que puede bloquear las longitudes de onda de excitación y registrar la emisión de un fluoróforo [Lucia M.A. Crane y col., Et al. 2010; (44): 2225.]. Un sensor adicional puede registrar la imagen de reflexión con una ruta de imagen diferente. Este concepto es simple, pero el uso de múltiples sensores, divisores de haz o lentes de objetivo aumenta el tamaño, la complejidad del diseño y el coste.

[iluminación de cambio rápido]

Otra solución para la formación de imágenes multiespectrales utiliza la conmutación entre diferentes luces de excitación. Allí, el objeto se ilumina alternativamente con haces de excitación que tienen un espectro de excitación específico que es bloqueado por filtros para entrar en una o más cámaras. En el documento US 20130286176 A1 se utiliza un sensor de un solo color, una excitación láser para excitar la fluorescencia y una fuente de iluminación de banda ancha que se enciende y apaga. Cuando solo está encendida la fuente de excitación láser, el sensor puede capturar la fluorescencia emitida, y cuando la iluminación de banda ancha está encendida, el sensor puede capturar la imagen reflejada. Este sistema produce una imagen de reflectancia y una imagen de un fluorocromo, pero un observador puede experimentar visualmente un parpadeo perturbador debido al encendido y apagado de las diferentes fuentes.

[Bloqueo de varias imágenes de paso de banda]

Incluso otro enfoque utiliza filtros con múltiples regiones de paso de banda emparejadas con un sensor monocromático. En este enfoque, un filtro delante de un sensor monocromático bloquea las longitudes de onda de excitación para que no entren al sensor monocromático. Se pueden formar imágenes de los diferentes fluoróforos individualmente con exploración de excitación. Alternativamente, la luz fluorescente multicomponente filtrada se puede dividir en rutas dependientes de la longitud de onda que luego se forman en imágenes sobre diferentes regiones espaciales de un sensor monocromático. Con este enfoque, es posible registrar múltiples canales simultáneamente con un sensor monocromático.

En un enfoque alternativo, se pueden utilizar sensores de color para registrar la luz fluorescente multicomponente con un sensor multicanal (y por tanto de color). La salida del sensor multicanal se puede procesar para obtener los componentes fluorescentes individuales.

Se puede usar un sensor adicional para registrar la imagen de reflectancia dividiendo la luz de excitación reflejada en una imagen de ruta óptica diferente formando imagen de esa luz en ese sensor. Esto ofrece múltiples bandas de formación de imágenes de fluorescencia junto con la reflectancia, pero un observador percibirá visualmente una representación de colores falsos. Dependiendo de las longitudes de onda de excitación específicas, es posible que la percepción falsa no se pueda corregir ni siquiera digitalmente.

Es posible dividir aún más tanto la reflectancia como la fluorescencia en múltiples sensores de color adicionales para aumentar el número de canales espectrales. Cada canal tiene un filtro de paso de banda estrecho delante del sensor y se calcula la intensidad en cada banda de filtro estrecha individual [US 20120085932 A1].

Los conjuntos de filtros utilizados se conocen como "Pinkel", "Sedat" o "Full-multibanda", dependiendo de la combinación exacta de filtros de excitación y emisión utilizados en la aplicación específica.

La presente invención se hace para proporcionar un método y medios para la formación de imágenes multiespectrales, que evitan los problemas mencionados anteriormente de la técnica anterior y son simples, rápidos y rentables.

Este problema se resuelve mediante el método según la reivindicación 1 y el aparato según la reivindicación 9, así como el endoscopio o microscopio quirúrgico según la reivindicación 15 y sus usos según la reivindicación 16. En las respectivas reivindicaciones dependientes se proporcionan mejoras ventajosas.

Según la presente invención, se proporciona un método para la adquisición de imágenes de fluorescencia y reflectancia de un objeto. En este método inventivo, un objeto se ilumina alternativamente con dos luces diferentes. Estas al menos dos luces diferentes comprenden al menos una primera luz y una segunda luz, que se dirigen alternativamente sobre el objeto. La primera luz tiene varias regiones espectrales de alta intensidad y regiones de baja intensidad, que son de mayor longitud de onda que las regiones de alta intensidad y en donde las regiones espectrales de alta intensidad de la primera luz y las regiones de baja intensidad de la primera luz se disponen alternando a lo largo del eje de longitud de onda espectral, mientras que la al menos segunda luz tiene al menos una región espectral de alta intensidad y al menos una región espectral de baja intensidad que es de mayor longitud de onda que su región de alta intensidad.

Durante la iluminación alterna del objeto con estas dos luces, una agrupación de sensores común registra imágenes. Durante la iluminación del objeto con la primera luz y la segunda luz, se registran imágenes separadas del objeto iluminado. Además se atenúa la luz registrada, es decir, la luz emitida por el objeto y dirigida sobre la agrupación de sensores común en las varias regiones espectrales, en las que la primera luz tiene alta intensidad.

- 5 Iluminando alternativamente el objeto con dicha primera luz y dicha segunda luz, durante la iluminación con la primera luz es posible así registrar una imagen de fluorescencia del objeto. Durante la iluminación con la segunda luz, es posible registrar una imagen de reflectancia del objeto.

- 10 En una primera mejora ventajosa, la agrupación de sensores, que es común para registrar la imagen de fluorescencia y la imagen de reflectancia alternativamente, es una agrupación multicanal, preferiblemente una agrupación de sensores de color. Una agrupación multicanal de este tipo registra las imágenes en el espacio de imagen de canal, por ejemplo, en el espacio de imagen de color de un sensor de color. Estos datos de imagen se transforman luego en valores de un espacio de imagen de componentes, donde el espacio de componentes corresponde preferiblemente a las distribuciones espaciales de fluorocromos, absorbedores, valores derivados de los mismos o ruido. Así, en la presente invención, las primeras imágenes se registran en el espacio de imagen de canal, por ejemplo, en el espacio de imágenes en color, y luego se transfieren a una imagen, que muestra, p. ej., distribución lateral de fluorocromos específicos, absorbedores, etc.

- 15 Como se mencionó anteriormente, la primera luz tiene varias regiones espectrales de alta intensidad y regiones espectrales de baja intensidad, mientras que la segunda luz tiene al menos una región espectral de alta intensidad y al menos una región espectral de baja intensidad. Para registrar las imágenes de fluorescencia e imágenes de reflectancia mencionadas anteriormente, la relación de intensidad de luz entre una región de alta intensidad a una longitud de onda más corta y una región vecina de baja intensidad a una longitud de onda más larga es de al menos $1 \cdot 10^2$, preferiblemente $\geq 1 \cdot 10^6$.

- 20 Además, como se mencionó anteriormente, la luz registrada por la agrupación de sensores se atenúa en las diversas regiones espectrales en las que la primera luz tiene altas intensidades. La relación de atenuación entre la intensidad de la región espectral no atenuada y atenuada es preferiblemente de al menos $1 \cdot 10^2$, preferiblemente al menos $1 \cdot 10^3$, preferiblemente al menos $1 \cdot 10^6$.

En particular, la luz registrada por la agrupación de sensores puede filtrarse mediante un filtro de paso de banda múltiple.

- 30 En una disposición preferible de la presente invención, la primera luz y/o la segunda luz son generadas por luz de banda ancha, que luego es filtrada por los respectivos filtros de paso de banda múltiple para generar la primera luz y la segunda luz. Para lograr eso, dichos filtros de paso de banda múltiple para la primera luz y la segunda luz pueden tener regiones de filtro complementarias, de modo que los intervalos de alta intensidad de luz de la primera luz se alternan con los intervalos de alta intensidad de luz de la segunda luz.

- 35 Para la primera luz y la segunda luz se puede lograr una distribución de luz similar mediante el uso de múltiples fuentes de luz de banda estrecha para la primera luz y la segunda luz, donde los picos de emisión de las fuentes de luz utilizadas para la primera luz y los picos de emisión de la luz las fuentes de la segunda luz se alternan a lo largo del eje de longitud de onda espectral.

También son posibles combinaciones de los conceptos mencionados anteriormente para generar la primera luz y la segunda luz.

- 40 Mediante tal disposición, es posible registrar alternativamente imágenes de fluorescencia e imágenes de reflectancia en las mismas regiones espectrales transmitidas por el filtro de paso de banda múltiple delante de la agrupación de sensores común. En un escenario preferible, las regiones de longitudes de onda, que están excluidas del registro por dicho filtro de paso de banda múltiple delante de la agrupación de sensores común, pueden no ser críticas para la visualización de la imagen de reflexión, ya que las partes espectrales registradas se pueden usar para reconstruir una imagen en color.

- 45 A medida que se forman imágenes de un mayor número de componentes (es decir, fluoróforos), se pueden registrar imágenes separadas utilizando un mayor número de primeras luces diferentes. El número de componentes (fluorocromos) que pueden estar sin mezclar depende principalmente del número de canales de color. Usando, por ejemplo, un sensor RGB, pueden estar sin mezclar hasta 3 fluorocromos. Por ejemplo, utilizando una primera luz adicional con el mismo sensor RGB, pueden estar sin mezclar hasta 6 fluorocromos. Preferiblemente, dichas primeras luces deben adaptarse al espectro de excitación de dichos fluoróforos, mientras que la luz registrada debe seleccionarse de acuerdo con el espectro de emisión de todos los fluoróforos de interés. Para medir imágenes de fluorescencia, podría ser necesario mantener oscuros los alrededores del aparato de formación de imágenes durante el registro de imágenes, con el fin de reducir la luz no fluorescente. Sin embargo, en particular en aplicaciones médicas, podría ser necesario proporcionar luz ambiental adicional para que el operario pueda ver el entorno. Para este propósito, se sugiere iluminar alternativamente el objeto con al menos una primera luz y al menos una segunda luz y además en un período de tiempo adicional con pulsos de una luz adicional, en donde la duración de pulso de la luz adicional es corta en comparación con los periodos de iluminación usados para iluminar el objeto con la al menos

primera luz y la al menos segunda luz. Dicha luz adicional también puede aplicarse durante la aplicación de al menos la primera luz o la segunda luz, mientras se detiene el registro de la primera imagen y la segunda imagen durante la iluminación con dicha luz adicional. Preferiblemente, los pulsos de luz de la luz adicional son correspondientemente cortos en comparación con la duración de la primera o la segunda luz.

- 5 Dicha luz adicional puede ser entonces suficientemente fuerte para proporcionar suficiente luz para observar estos alrededores a las personas que trabajan en los alrededores del aparato inventivo de formación de imágenes. Si la frecuencia de dichas partes de luz adicional es lo suficientemente alta, a las personas que trabajan en los alrededores se les puede proporcionar un efecto visual continuo.

10 A continuación se proporcionan diferentes ejemplos de la presente invención. En los mismos, para elementos similares o iguales se utilizan números de referencia similares o iguales. En los siguientes ejemplos, se puede describir una combinación de características que son esenciales y opcionales para la presente invención. Sin embargo, cada una de las características opcionales descritas en dicha combinación puede usarse para adaptar la invención por separado y individualmente dentro del alcance que se describe en las presentes reivindicaciones.

15 Los ejemplos se muestran en combinación con las Figuras 1 a 35, que muestran todos aspectos de ejemplos inventivos.

Ejemplo 1

La Figura 1 describe el concepto general de la invención. El sistema inventivo comprende un sistema de iluminación 100 que produce y guía luz que incorpora propiedades espectrales y de multiplexación de tiempo para iluminar un objeto 400. La luz que emana del objeto 400 es recogida y detectada o se forman imágenes mediante un sistema de formación de imágenes 200 que se compone de elementos como lentes, filtros y una agrupación de sensores/detectores de luz (es decir, una cámara), etc. Tanto el sistema de iluminación 100 como el sistema de detección 200 se conectan a una unidad de control y procesamiento (300) que controla el funcionamiento del sistema de iluminación 100, sincroniza el funcionamiento y captura las imágenes del sistema de detección 200 y procesa los datos de imagen para su posterior evaluación, exposición y almacenamiento. Finalmente, un sistema de exposición/visualización 500 muestra las imágenes descompuestas por separado o simultáneamente/en superposición.

El sistema de iluminación 100 funciona en dos (o más) fases alternas como se muestra en la Figura 2. La Figura 2A muestra el curso temporal de las diferentes fases, la Figura 2B el espectro de la primera luz, Figura 2C el espectro de la segunda luz y la Figura 2D la transmisión de la luz incidente a detectar.

30 En la fase 1, el sistema ilumina el objeto con luz que exhibe una forma espectral con áreas de intensidades alta y baja como se representa en la Figura 2B. Son posibles diversas formas espectrales, pero es esencial que la luz tenga regiones espectrales con muy baja intensidad en longitudes de onda más largas que las regiones de alta intensidad. En esas regiones, la luz fluorescente emitida por el objeto tras la excitación con la primera luz puede ser detectada por el sistema de formación de imágenes sin detectar cantidades relevantes de luz reflejada. En la fase 2, el objeto se ilumina con una luz de banda ancha como se muestra en la Figura 2C.

El sistema de formación de imágenes 200 comprende un canal/ruta de formación de imágenes. El canal de formación de imágenes tiene una configuración de agrupación de sensores de imagen para detectar y registrar imágenes de fluorescencia y reflectancia en las diferentes fases. La luz que llega al sensor de imagen se atenúa espectralmente de modo que, en general, la luz de iluminación de la fase 1 se atenúa antes de llegar al sensor de formación de imágenes como muestra el espectro de transmisión del atenuador en la Figura 2D.

40 Al alternar la iluminación del objeto, es posible registrar alternativamente imágenes complementarias de reflectancia y fluorescencia con el mismo sensor en las mismas regiones espectrales. En la fase de iluminación 1, las bandas espectrales de la luz reflejada por el objeto se atenúan y esencialmente solo la emisión de fluorescencia es transmitida y detectada por la agrupación de sensores formando una imagen de fluorescencia, mientras que en la fase 2 la luz reflejada por el objeto se transmite parcialmente y se registra con el sensor para formar una imagen de reflectancia.

La cantidad de atenuación de las regiones espectrales a atenuar antes de que la luz llegue al sensor se puede estimar aproximadamente de modo que cuando el sensor se use preferiblemente para detectar fluorescencia, la señal de fluorescencia detectada debería ser preferiblemente mayor que el traspaso de la luz de excitación.

Ejemplo 2

50 Una de las realizaciones preferidas se muestra en la Figura 3. En el mismo se utilizan dos fuentes de luz blanca de banda ancha (111 y 121), que pueden encenderse y apagarse alternativamente. Una se filtra con un filtro de paso de banda múltiple 122. Los dos haces de estas dos fuentes 111 y 121 se combinan mediante un espejo policromo de paso de banda múltiple 101. Entre esos elementos, se pueden colocar opcionalmente lentes de colimación para guiar más luz al área de la que se van a formar imágenes. La luz emitida por el objeto 400 se recoge en el sistema de detección 200 con una lente de objetivo 201 (o un sistema de lentes que actúa como lente de objetivo), que para su uso en cirugías abiertas tiene preferiblemente una distancia de enfoque de 200 mm. Un filtro de paso de banda múltiple

213 que es complementario al filtro 122 atenúa el haz. A continuación, se forman imágenes del haz filtrado mediante una agrupación de sensores multicanal o multicolor 211. La unidad de procesamiento/control 300 está compuesta por un capturador de fotogramas 301, una unidad de control 302 y una unidad de procesamiento 303 para generar imágenes 501, ..., 507..... Entre los diversos elementos se pueden usar lentes opcionales 212, 214 para transmitir la imagen al sensor. El filtro de paso de banda múltiple 213 se coloca preferiblemente en un espacio de formación de imágenes ópticamente corregido al infinito.

Los filtros de paso de banda múltiple y el filtro policromo se fabrican generalmente como conjuntos de filtros de excitación/emisión/espejo para su uso en microscopía de fluorescencia como Sedat, Pinkel o juegos multibanda completos. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de espectros de transmisión de un conjunto de filtros de cuatro bandas que se configura originalmente para formar imágenes de cuatro fluorocromos. El "filtro de excitación" se usa en la posición 122, el "espejo policromo" en 101 y el "filtro emisor" en la posición 213. Se pueden usar diversas combinaciones diferentes de filtros y diversos conjuntos de filtros para diversas aplicaciones de fluorocromos. Por lo general, hay una pequeña holgura entre las bandas de transmisión de filtro para evitar la diafonía (consultar los esquemas). La anchura de esa banda depende de las características del filtro para operar bajo un intervalo de ángulos de incidencia combinado con el requisito del conjunto de filtros para funcionar en un entorno con condiciones realistas.

El uso de un conjunto de filtros de este tipo para los dos modos de iluminación significa que en la fase 1 el filtro de excitación del conjunto se usa para filtrar la luz blanca que se origina en la fuente 111, el espejo policromo se usa como elemento 101 para combinar los haces de las fuentes 111 y 121 en uno, y el filtro de emisión se usa como filtro 213 en 122 para bloquear la luz de excitación de 111. En términos prácticos y asumiendo concentraciones nominales de fluorocromos en el tejido (generalmente entre 100×10^{-9} M hasta 1×10^{-3} M con $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/litro}$) la relación de atenuación habitual en las bandas de rechazo de interferencia múltiples filtros de paso de banda de densidad óptica (DO) de 6 órdenes de magnitud es suficiente, sin embargo se espera que en muchos casos puede ser adecuada una atenuación de 2 o 3 sobredosis.

En la fase 1, el objeto 400 se ilumina con luz de forma espectral procedente de la fuente 111 que es reflejada, transmitida y absorbida al menos parcialmente por el objeto 400 para excitar la fluorescencia. La luz de excitación reflejada por el objeto 400 en la fase 1 es atenuada por el filtro de emisión 213 delante del sensor 211, que por tanto registra únicamente la emisión de fluorescencia. En la fase 2, el objeto 400 se ilumina con luz de banda ancha procedente de la fuente 121. Esta luz es reflejada parcialmente por el objeto 400, que emite luz reflejada y fluorescencia. El filtro 213 transmite únicamente algunas bandas de luz reflejada y emitida por fluorescencia. Dado que la intensidad de la luz de fluorescencia suele ser muchos órdenes de magnitud menor que la luz reflejada, se puede suponer que prácticamente solo se registra una imagen de reflectancia. En resumen, en la fase 1 el sensor 211 registra la fluorescencia y en la fase 2 registra la imagen de reflectancia del objeto en las regiones espectrales donde el filtro 213 muestra suficiente transmisión. Por lo general, la imagen de fluorescencia tiene una intensidad mucho más baja que la imagen de reflectancia. Para adaptarse a los diferentes rangos dinámicos, se debe utilizar un tiempo de exposición más largo para la imagen de fluorescencia. Tal secuencia de las fases y las imágenes se muestra en la Figura 5. Aquí, la Figura 5A muestra la secuencia oportuna de las fases de iluminación 1 y 2, donde la fase 1 es más larga que la fase 2. La Figura 5B muestra la secuencia oportuna de las fases de detección 1 y 2 donde las fases 1 para la detección de imágenes de fluorescencia son más largas que las fases 2 para la detección de imágenes de reflectancia.

El control de la iluminación del objeto y la exposición del sensor se proporciona a partir de señales en la unidad de procesamiento y control 300. Las dos fuentes de luz de banda ancha 111 y 121 pueden ser lámparas incandescentes, lámparas de gas (como Hg, Xe o mezclas), diodos emisores de luz (ledes) o cualquier otra fuente de luz de banda ancha. Las fuentes de led se pueden encender y apagar a una frecuencia alta, con tiempos de subida y bajada más rápidos que 100 microsegundos. Tal sistema puede iluminar el objeto con fases alternas a una velocidad de vídeo, es decir, aproximadamente a 25 fps (fotogramas por segundo). Con esta y con tasas de iluminación más altas, la percepción visual del campo de iluminación es uniforme, donde apenas se observa ningún efecto de parpadeo.

El sensor 213 es preferiblemente un sensor multicanal (multicolor) que tiene la capacidad de registrar las imágenes con múltiples canales. Cada área espectral tiene una sensibilidad espectral distinta y registra la luz reflejada de un multiplex espectral de diversas sustancias reflectantes y fluorescentes en el objeto. Ejemplos de agrupaciones de sensores de color multicanal son los sensores de patrón RGB (rojo-verde-azul) o CMYG (cian-magenta-amarillo-verde). Las sensibilidades de color típicas de diferentes tipos de sensores de color se muestran en la Figura 6. En la Figura 6A, se muestran las sensibilidades de los elementos de sensor rojo, verde y azul de un sensor RGB. En la figura 6B se muestran las sensibilidades de los elementos de sensor cian, magenta, amarillo y verde de un sensor CMYG. Por tanto, los datos registrados por estos sensores son datos en un espacio de color respectivo, es decir, un espacio abarcado por los colores respectivos, p. ej. RGB o CMYG.

La Figura 7 describe los espectros de excitación y los espectros de emisión de fluorescencia de los espectros de emisión de fluorescencia típicos de fluoróforos típicos como isotiocianato de fluoresceína-FITC (Figura 7A), Atto647 (Figura 7B) y verde de indocianina - ICG (Figura 7C).

Las imágenes que se registran se transfieren luego desde el sensor 213 a la unidad de procesamiento 300 para una serie de operaciones de procesamiento de imágenes, tales como demostración, alineamiento, filtrado de ruido,

sustracción de ruido oscuro de fondo, corrección de color para los fotogramas de color y desmezcla espectral. En particular, la desmezcla espectral en la forma más simple puede ser una transformación lineal entre las imágenes de canal de color generadas a partir de la cámara y el espacio de componentes. Los componentes pueden ser cualquier cosa de la que la luz pueda transportar información, como materiales, concentraciones o propiedades, o cantidades que puedan derivarse de esos componentes. Pueden tener una distribución espacial particular correspondiente a los elementos 401, 402 del objeto 400. Después del cálculo de las imágenes 501,..., 507 de la distribución espacial de los componentes 401, 402, etc., se pueden almacenar, mostrar o superponer a otras imágenes, con el uso de mapas de color, como pseudocolor.

Algunos ejemplos de imágenes después de la desmezcla espectral, pero no se limitan a estos, muestran:

a) Distribución de absorbedor: El espectro de la luz reflejada está conformado por el espectro de absorción y transmisión en el tejido del objeto 400, y esto se registra en las señales de sensor de color. Mediante el modelado de sistemas y tejidos de la absorción de tejidos y/o la calibración de sistema en absorbedores con concentraciones conocidas, es posible derivar la concentración de absorbedores de tejido intrínsecos como hemoglobina oxigenada y desoxigenada, melanina, etc. o también agentes de contraste de absorción administrados externamente, p. ej. azul de metileno.

b) Saturación de oxígeno: A partir de los mapas de distribución de hemoglobina oxigenada y desoxigenada es posible calcular un mapa de saturación de oxígeno y parámetros fisiológicos o patológicos relevantes.

c) Distribución de fluorocromos: la fluorescencia proviene de fluorocromos endógenos o de agentes de contraste fluorescentes administrados externamente. Las señales de fluorescencia son registradas por el sensor de color y el modelado de tejido y sistema y/o la calibración de sistema es posible para derivar la distribución de fluorocromos. Además, es posible calcular relaciones entre mapas de fluorocromos, que transmiten información más específica sobre el cáncer. A continuación se presenta una descripción básica para el procesamiento de imágenes para el cálculo de los componentes de fluorescencia. Los valores similares, como la distribución de absorción de reflectancia y los valores derivados, se modelan y calculan de manera similar.

En la presente invención, la cámara mide la intensidad de señal de diferentes canales de color. Esta señal es creada por la intensidad de luz de la suma de todos los componentes, que son filtrados espectralmente por los filtros de transmisión y adicionalmente por los filtros de color RGB del sensor 211 combinados con la sensibilidad espectral del sensor 211. Suponiendo que la respuesta del detector es lineal, la señal generada es:

$$S_{c \in \{color\}} = \int_{\lambda_{min}=0}^{\lambda_{max}=\infty} \sum_{f \in \{canales\} \text{ fluorescentes}} I_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda \quad \forall c \in \{color\}$$

donde SC es la señal en un color espectral específico c de todas las imágenes de sensor de color combinadas; por ejemplo {color} = {R, G, B}. $I_{\lambda}(\lambda, f)$ es la densidad de intensidad de canal de fluorescencia espectral. Depende de la longitud de onda y del canal de fluorescencia. Cada canal de fluorescencia se caracteriza por una característica de luz espectral específica. En el caso más simple, la característica de luz espectral de un canal de fluorescencia del sistema de formación de imágenes corresponde a un fluoróforo. En este caso el $I_{\lambda}(\lambda, f)$ corresponde al espectro de emisión espectral del fluoróforo. En este caso, se puede determinar un valor exacto de $I_{\lambda}(\lambda, f)$ considerando la concentración de fluoróforos, el rendimiento cuántico de fluoróforos y la intensidad de luz de iluminación espectral. T (λ, c) son las características de transmisión totales del sensor de color espacial específico o píxel que también exhibe las características de transmisión del sistema óptico, incluido el filtro de emisión. Suponiendo que la actividad de fluorescencia se encuentra cerca de la superficie del tejido de modo que el perfil espectral de emisión de fluorescencia y la intensidad no estén fuertemente influenciados por la absorción intrínseca del tejido, y que otros efectos no lineales como la extinción son insignificantes, entonces la intensidad espectral del fluoróforo $I_{\lambda}(\lambda, f)$ se puede escribir como $I_{\lambda}(\lambda, f) = c(f) * \Phi_{\lambda}(\lambda, f)$:

$$S_{c \in \{color\}} = \int_{\lambda_{min}=0}^{\lambda_{max}=\infty} \sum_{f \in \{canales\} \text{ fluorescentes}} c(f) * \Phi_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda \quad \forall c \in \{color\}$$

donde c(f) es la concentración del fluoróforo f. En caso de que el canal de fluorescencia f se utilice para la formación de imágenes de reflectancia, c(f) es el factor de intensidad. El símbolo de la concentración c es el mismo que el del índice de canal de color. $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ es la densidad de intensidad de fluorescencia espectral molar describe el perfil espectral de la emisión de un fluoróforo f. La intensidad se escala por la concentración del fluoróforo c(f). En caso de que f sea un canal de reflectancia, $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ es la intensidad de reflectancia espectral normalizada de un canal con una distribución espectral.

Como ejemplo, $\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ podría ser la respuesta espectral del receptor rojo en el ojo. Esto daría lugar a una impresión de color natural para este canal rojo. Después de reorganizar la formulación

$$S_{c \in \{color\}} = \sum_{f \in \{canales\ fluorescentes\}} c(f) * \underbrace{\int_{\lambda_{min}=0}^{\lambda_{max}=\infty} \Phi_{\lambda}(\lambda, f) * T(\lambda, c) d\lambda}_{M(f, c)} \quad \forall c \in \{color\}$$

conduce a la relación lineal entre la concentración de fluoróforo y la intensidad de canal medida del sensor:

$$S_{c \in \{color\}} = \sum_{f \in \{canales\ fluorescentes\}} c(f) * M(f, c) \quad \forall c \in \{color\}$$

5 Esta relación lineal permite calcular todas las intensidades de canal de fluorescencia y reflectancia $c(f)$. Aquí, se muestra un ejemplo del cálculo de la matriz M para un sensor con los canales rojo, verde y azul y los tintes isotiocianato de fluoresceína (FITC), Atto647 y verde de indocianina (ICG). Los espectros de excitación y emisión del fluoróforo se muestran en la Figura 7:

Las ecuaciones de señal son:

$$\begin{aligned} S_{rojo} &= c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{rojo}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{rojo}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{rojo}) \\ 10 \quad S_{verde} &= c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{verde}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{verde}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{verde}) \\ S_{azul} &= c(\text{FITC}) * M(\text{FITC}, \text{azul}) + c(\text{Atto647}) * M(\text{Atto647}, \text{azul}) + c(\text{ICG}) * M(\text{ICG}, \text{azul}) \\ \begin{pmatrix} S_{rojo} \\ S_{verde} \\ S_{azul} \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} M(\text{FITC}, \text{rojo}) & M(\text{Atto647}, \text{rojo}) & M(\text{ICG}, \text{rojo}) \\ M(\text{FITC}, \text{verde}) & M(\text{Atto647}, \text{verde}) & M(\text{ICG}, \text{verde}) \\ M(\text{FITC}, \text{azul}) & M(\text{Atto647}, \text{azul}) & M(\text{ICG}, \text{azul}) \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} c(\text{FITC}) \\ c(\text{Atto647}) \\ c(\text{ICG}) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Con los coeficientes M ejemplares escritos para la combinación de FITC y el canal detector rojo:

$$M(\text{FITC}, \text{rojo}) = \int_{\lambda_{min}=0}^{\lambda_{max}=\infty} \Phi_{\lambda}(\lambda, \text{FITC}) * T(\lambda, \text{rojo}) d\lambda$$

15 Las intensidades de fluorescencia se pueden obtener invirtiendo la matriz de coeficientes M :

$$\begin{pmatrix} c(\text{FITC}) \\ c(\text{Atto647}) \\ c(\text{ICG}) \end{pmatrix} = M^{-1} * \begin{pmatrix} S_{rojo} \\ S_{verde} \\ S_{azul} \end{pmatrix}$$

Si, en una realización preferible, el número de canales de color de detector es igual al número de canales fluorescentes a resolver, el sistema de ecuaciones se puede resolver como un sistema lineal de ecuaciones. Las variables SC son medidas por el sistema de formación de imágenes. Los valores de $c(f)$ se pueden calcular si se conocen los demás parámetros del sistema ($\Phi_{\lambda}(\lambda, f)$ y $T(\lambda, c)$). Estos factores y , por tanto, la matriz $M(f, c)$ se pueden determinar de antemano en un proceso de calibración. Para calcular $c(f)$ es necesario invertir la matriz $M(f, c)$.

Si el número de canales medidos es mayor que el número de canales de fluorescencia, el sistema está sobredeterminado. Una opción para manejar esta situación favorable es calcular la pseudoinversa de $M(f, c)$ que ya no es una matriz cuadrada. Pueden usarse diversos algoritmos para mejorar el resultado del cálculo y , por ejemplo, minimizar el ruido que se origina en las mediciones en los sensores.

La matriz M se puede calcular a partir del modelado del sistema y/o de la calibración de sistema. En el modelado de sistema, el contenido espectral de ruta de luz se puede modelar desde la fuente de luz hasta los píxeles de agrupación de sensores de color. Los parámetros incluyen, entre otros, la distribución espectral de la fuente de iluminación, la transmisión espectral de los filtros de excitación o el perfil espectral de las luces de iluminación, los espectros de excitación y emisión de fluorocromos y el rendimiento cuántico, la profundidad aproximada de los componentes en el tejido, la propiedades ópticas del tejido, las características de transmisión del sistema de formación de imágenes (lentes, divisores de haz, filtros, espejos, etc.) y/o las sensibilidades espectrales de la agrupación de sensores. El modelado calcula la matriz M que asocia la información de concentración con las señales registradas (problema directo). La distribución de componentes se puede derivar de la solución del problema inverso. Alternativamente, la calibración de sistema se puede realizar con el registro de las señales de los componentes de composición, concentración y ubicación conocidas, y luego resolviendo la matriz desconocida M , o mediante una descomposición ciega con algoritmos de desmezcla, como el análisis de componentes principales (PCA), análisis de componentes independientes (ICA) o algoritmos estadísticos similares. Finalmente, el modelado o en general el uso de información previa se puede utilizar para determinar más parámetros desconocidos que el número de canales medidos.

Alternativamente al modelado lineal, el sistema se puede modelar con más detalle utilizando una descripción no lineal. De esta forma es posible tener en cuenta el potencial de no linealidades, como el detector o el efecto de extinción de altas concentraciones de fluorocromo. Finalmente, con modelado y/o información previa es posible calcular una matriz que recupere la información de más componentes que el número de canales disponibles en lo que de otra manera

sería un sistema infradeterminado.

[número de bandas espectrales]

Finalmente, como se describió anteriormente, el número de componentes sin mezclar está relacionado con el número de canales (por ejemplo, colores) disponibles del sensor o, en el caso de imágenes combinadas, el número total de canales de color de las imágenes combinadas. Sin embargo, el número de bandas espectrales en la iluminación y/o la transmisión es independiente del número de canales (colores) y del número de componentes sin mezclar. En general, cuantas más bandas estén disponibles en la región de interés, menos probable es que no se registre una característica espectral de un componente en particular. Por lo tanto, muchas bandas espectrales "estrechas" ofrecen una representación de color más precisa de la imagen de reflectancia y una desmezcla más precisa de los diversos componentes. Sin embargo, la desmezcla espectral de diversos componentes es factible con un número de bandas espectrales menor que el número de canales.

Es importante resaltar que el número de bandas espectrales de filtros multibanda no es una condición matemática relevante para que el número de fluoróforos no se mezclen. En cambio, el número de canales de cámara es la condición matemáticamente importante.

Ejemplo 3

A continuación, describimos una fuente de luz básica útil para la presente invención y diversas alternativas.

Como se describió anteriormente y como se muestra en la Figura 8, la fuente de luz más básica 100 consiste en dos fuentes de luz independientes 111, 121, que son preferiblemente ledes de banda ancha 111 y 121. Los ledes generalmente tienen un rendimiento de conmutación muy rápido en comparación con las fuentes de luz convencionales tales como lámparas halógenas o de xenón. Los haces se coliman opcionalmente con lentes de colimación 119 y 129. La luz que emana de la fuente 121 se filtra mediante el filtro de paso de banda 122 y luego se combina con luz que emana de la fuente 121 utilizando un espejo policromo 101.

La Figura 9A muestra el espectro de los ledes de banda ancha, que pueden ser iguales o diferentes para la fuente de luz 111, 121. El espectro es típico para un led de luz blanca. La Figura 9B muestra el espectro de transmisión del filtro de excitación multibanda 122. La Figura 9C proporciona un espectro de intensidad de la luz emitida por la fuente de led 121 y filtrada por el filtro 122.

En una realización preferible, el espectro de emisión de las dos fuentes de led de alta potencia de banda ancha con una densidad de potencia espectral máxima es superior a 30 mW/nm. La luz emitida es filtrada por un filtro de paso de banda múltiple como se muestra en la Figura 9B. El filtro tiene bandas de transmisión (420 - 460 nm, 510,5 - 531,5 nm, 590 - 624 nm, 677,5 - 722,5 nm) con una transmisión máxima aproximada del 90% en cada banda de transmisión. Las características de atenuación del filtro en las regiones de bloqueo son típicamente al menos de densidad óptica 2 (DO 2). Por lo general, las características de atenuación/rechazo fuera de banda de los filtros son tan buenas como el DO 6.

La emisión efectiva de la fuente de luz después de filtrar con el filtro multibanda respectivo se ilustra en la Figura 9C. El espectro de la primera luz (fuente 121) está conformado por el filtro durante esta fase de iluminación y el espectro de la segunda luz (fuente) es el perfil de emisión intrínseco de banda ancha como se muestra en la Figura 9A o una banda ancha similar. Así, todos los espectros de luz dibujados son espectros acumulados durante la fase respectiva.

Una posible desventaja de esta fuente de luz básica es que el campo de iluminación puede no ser óptimo para la percepción visual de un observador tanto en términos de intensidad como de contenido espectral. Las dos luces tienen diferente intensidad general y contenido espectral y cuando se alternan pueden presentar un parpadeo visual de intensidad o color. Además, el contenido espectral no está equilibrado y la apariencia de color puede no ser natural.

Una fuente de iluminación alternativa es una variación de la fuente de luz básica, con la diferencia de que la segunda luz también se filtra con un filtro 112 como se muestra en la Figura 10A. La ventaja básica de filtrar la segunda luz es que facilita la optimización de la percepción general del color y minimiza el parpadeo. El filtro 112 también puede ser un filtro de paso de banda múltiple. Sus características de transmisión espectral pueden ser complementarias a las del filtro 122 y pueden tener las mismas o similares características de transmisión al filtro de emisión de fluorescencia 213 delante de la agrupación de sensores 211. La Figura 10B proporciona el espectro de la primera luz de excitación en una primera fase emitida por la fuente de luz 121 después de filtrar por el filtro 122. La Figura 10C proporciona el espectro de la segunda luz de excitación en una segunda fase emitida por la fuente de luz 111 después de filtrar por el filtro 112. Los filtros complementarios 112 y 122 proporcionan acumulativamente una iluminación espectralmente continua que es casi igual a una iluminación de banda ancha por la fuente de banda ancha original proporcionando así una percepción natural del color. Además, el efecto de la intensidad o el parpadeo de color es menor. No obstante, la forma espectral de la iluminación luminosa de la segunda luz (fase 2) puede modificarse libremente para conseguir una percepción óptima de color y un mínimo parpadeo de intensidad.

Además, la salida de la fuente de luz 100 se puede acoplar a una guía de luz mediante un sistema de lentes de acoplamiento de fibra. Esta guía de luz puede ser una sola fibra óptica, un fardo de fibras o una guía de luz líquida.

En una implementación alternativa de un sistema de iluminación como se muestra en la Figura 11, una o más de las fuentes de luz de banda ancha que se filtran con los filtros multibanda se reemplazan por un conjunto de fuentes de banda estrecha 133, 143, 153 controladas individualmente, opcionalmente filtradas por respectivos filtros de banda estrecha 125. Tales fuentes 133-153 pueden ser láseres, diodos láser, ledes, etc. En la Figura 11, el módulo emisor de luz 111 de la Figura 10A ha sido reemplazada por múltiples fuentes láser 133, 143, 153. La luz emitida del módulo 123 es filtrada por el filtro 125. Los espejos policromos 101, 104, 105, 106 combinan la radiación de los láseres 133, 143, 153 con la radiación del láser 123. Todas las luces se acoplan juntas en una fibra 103.

El divisor de haz 101 puede ser un divisor de haz de polarización. De esta forma se pueden combinar las diferentes fuentes 123, 133, 143, 153 minimizando las pérdidas. Múltiples láseres 133, 143 y 153 y más pueden reemplazar una fuente de banda ancha, p. ej. la fuente 111 en la Figura 10. Los láseres 133, 143, 153 pueden tener un perfil de emisión espectral estrecho y/o pueden ser sintonizables. Algunos láseres pueden requerir un filtro de limpieza para suprimir la emisión espontánea amplificada no deseada. Los láseres también pueden sintonizarse en longitud de onda e intensidad, pueden ser láseres de onda continua o láseres pulsados. Las diferentes fuentes de láser se combinan mediante espejos policromos de paso largo 104 (longitud de onda de corte 415 nm,) 105 (longitud de onda de corte 650 nm) y 106 (espejo plano con alta reflectividad alrededor de 785 nm). Estas fuentes, o similares, de banda estrecha que comprenden la iluminación en una fase pueden iluminar simultáneamente, con superposición de tiempo total o parcial, o pueden funcionar secuencialmente. No obstante, cualquier combinación de tiempo dentro del período de exposición asociado con una fase de iluminación se considera una distribución espectral de luz acumulativa en una fase de iluminación.

Un escenario espectral preferido se ilustra en la Figura 12 donde una fuente led de banda ancha cubre todo el rango espectral y se combina con fuentes láser de banda estrecha que pueden ser preferiblemente (por razones de conmutación) diodos láser. En este caso, se utilizan módulos populares como módulos de diodos láser de 405 nm, 633 nm y 785 nm. El láser de diodo a 405 nm puede excitar la protoporfirina IX (PPIX), que se usa ampliamente en cirugía cerebral. El láser de diodo a 633 nm puede excitar un fluoróforo brillante y altamente estable como el Alexa647 utilizado en sondas fluorescentes, y el láser de diodo que emite a 785 nm excita el verde de indocianina clínicamente relevante (ICG).

Ejemplo 4

En este ejemplo, se utiliza un sistema de iluminación alternativo para generar las luces de iluminación con varias fuentes de luz led. Como se muestra en la Figura 13, en lugar de utilizar dos fuentes de led de banda ancha, esta opción utiliza varios ledes 121, 131, 141, 151... que tienen una emisión espectral estrecha. Esto requiere un dispositivo de iluminación más complicado, pero, por otro lado, la potencia de salida se puede aumentar drásticamente y la intensidad de los diferentes ledes se puede equilibrar de forma independiente. La mayoría de los ledes monocromáticos todavía tienen una emisión estrecha con colas en el espectro lateral. Por tanto, los filtros de excitación 122 132 142 152 pueden usarse opcionalmente delante de cada led para limpiar los espectros de excitación. De manera similar a las fuentes láser, la luz de una fuente led compuesta por muchas fuentes de banda estrecha puede considerarse como una luz de iluminación. Los ledes pueden iluminarse simultáneamente, con superposición de tiempo total o parcial, o pueden funcionar secuencialmente sin superposición. No obstante, cualquier combinación de tiempo dentro del período de exposición asociado con una fase de iluminación se considera una distribución espectral de luz acumulativa en una fase de iluminación.

Tales subsistemas de iluminación como el que se describe en la Figura 13 se pueden combinar en un sistema de iluminación multifásico como se muestra en el esquema de la Figura 14. En el mismo, se proporcionan dos fuentes de luz 100c y 100d, cada una acopla su luz emitida a fibras 103c y 103d, respectivamente para la iluminación de la muestra 400.

Las Figuras 15 a 18 muestran cada uno un espectro de emisión de una fuente de luz led, un espectro de transmisión de un filtro dispuesto en el haz emitido y un espectro de intensidad de la luz emitida después de pasar dicho filtro. Las cuatro fuentes de luz juntas pueden reemplazar una fuente de luz espectralmente de banda ancha.

Esta configuración preferida tiene un led de excitación para cada banda de los filtros multibanda. Esto requeriría 8 ledes individuales diferentes para filtros de paso de banda cuádruples. Los espectros de tal configuración se muestran en la Figura 19. La Figura 19 muestra en el lado izquierdo el espectro de 4 ledes, que constituyen la primera fuente de luz, el espectro de transmisión del filtro correspondiente y el espectro de emisión resultante de la primera luz. A la derecha, se muestran los espectros correspondientes para la segunda luz. En los espectros, ya está implícito, que cada uno de los ledes está asociado con una luz y, por lo tanto, con una fase. Sin embargo, el conjunto de 4 ledes individuales también se puede filtrar utilizando 4 filtros individuales de único paso de banda delante de cada led individual. Además, los ledes individuales no están estrictamente conectados a una de las fases. La Figura 20 muestra los espectros de emisión reales de 4 ledes disponibles comercialmente con máximos de emisión a 380 nm, 490 nm, 565 nm y 635. La Figura 21 muestra el perfil espectral de iluminación resultante de los cuatro ledes anteriores filtrados por un filtro de paso de banda cuádruple.

Ejemplo 5

En otro ejemplo que se muestra en la Figura 22, la conmutación temporal entre diferentes fuentes de luz se realiza utilizando elementos ópticos 168 y 165 con transparencia variable. En el caso más simple, estos elementos 168 y 165 con transparencia variable son obturadores mecánicos. También pueden ser moduladores de luz o dispositivos acústico-ópticos. La luz de banda ancha que emana de una fuente de luz 161 es dividida por un espejo policromo 162, luego filtrada por filtros de excitación complementarios 164 y 167 y fusionada nuevamente por un elemento policromo 169 similar al elemento 162. Los espejos 163 y 166 se utilizan para alinear y guiar el haz parcial filtrado por el filtro 165 en el sistema. Para mejorar aún más, la luz de excitación debe colimarse para minimizar las pérdidas y optimizar el rendimiento de filtro en el sistema.

Ejemplo 6

En una realización alternativa, como se muestra en la Figura 23 el sistema de iluminación se configura para iluminar a través del sistema óptico. Una guía de luz óptica entrega la luz desde el sistema de iluminación multiespectral 100 a una parte del dispositivo de formación de imágenes 200 en un puerto conector 204. La ruta de iluminación puede contener un sistema de lentes ópticas 203 para optimizar la iluminación del objeto 400. La luz es entonces filtrada por un filtro de polarización 206 y posteriormente combinada con la ruta de formación de imágenes con un dispositivo divisor de haz 205. Tal dispositivo puede ser un cubo divisor de haz de polarización 205. La luz pasa luego a través de una placa de media onda giratoria 207 que gira el ángulo de la polarización cuando la luz pasa a través. Esto permite reducir o eliminar los reflejos de la luz reflejada según la posición de la placa de media onda. En un ensamblaje fácil, la placa de media onda 207 se ubica delante de la lente de objetivo 201.

Ejemplo 7

A continuación se proporciona una descripción de diversos sistemas de detección alternativos.

Como descripción general, el sensor 211 es un sensor de color multicanal. Esto significa que el sensor registra el campo de luz en múltiples distribuciones espectrales distintas. Esto se puede lograr con diversas opciones: a) sensores que tienen microfiltros delante de los píxeles siguiendo el patrón de microfiltro Bayer RGGB o modificaciones de este como el RG(IR)B, el CMYG, b) cualquier otro patrón de mosaico de filtro donde cada píxel registra la luz con una distribución espectral distinta, y/o c) cualquier división de haz adicional, filtrado de color e formación de imágenes en sensores monocromáticos. Algunos de estos patrones se muestran en la Figura 24.

En general, el patrón RGGB logra una reproducción del color más precisa, mientras que el CMYG puede ser más sensible. La imagen en color de resolución completa se puede recuperar mediante reconstrucción, que puede tener lugar en el hardware de la cámara, o más tarde en el procesamiento de imagen. En general, el patrón de microfiltro se puede extender a múltiples colores o múltiples perfiles de transmisión espectral como ABCDEFGHI, etc. Un ejemplo como este es la agrupación de filtros dicróicos con patrones litográficos como se describe en el documento US 6638668 B2.

Alternativamente, el sensor de color multicanal puede basarse en sensor Foveon X3 (véase el documento US 6632701) o tecnologías similares como se muestra en la Figura 25. En contraste con los patrones de microfiltros, el sensor Foveon tiene fotosensores dispuestos espacialmente en las direcciones x e y, y que múltiples capas (capa 1, capa 2,...) están apiladas verticalmente. Cada capa es sensible a diferentes áreas espectrales debido a la absorción de silicio y las diferentes profundidades de transmisión para la capa sobre la luz, por lo que las imágenes generadas de cada capa corresponden a un color diferente. Con esto es posible lograr una mayor resolución espacial.

En realizaciones alternativas mostradas en la Figura 26A el haz de luz a detectar se divide en tres haces parciales paralelos con el uso de divisores de haz/o espejos 252, 253, 254, 255 y se filtra con filtros o con espejos dicróicos. Además, el sensor multicanal 211 como se muestra en la Figura 3 se reemplaza por un sensor monocromo 251. Cada filtro o espejo dicróico tiene un perfil espectral de transmisión particular, que transmite luz de uno de los tres colores diferentes como se muestra en la Figura 26B y C. Por tanto, en el sensor monocromático se forman diferentes imágenes lateralmente distantes entre sí, cada uno forma imágenes de una banda espectral diferente.

Además, se puede implementar un canal de múltiples colores con múltiples filtros y división de luz, como la geometría del prisma 3-CCD descrita en el documento US 3659918. En esta u otras implementaciones similares de división de luz, cada ruta se filtra para transportar luz con el espectro del color específico, por ejemplo, RGB. Este enfoque se puede extender a divisores de haz múltiple similares que ofrecen múltiples rutas de formación de imágenes (3 y más).

Ejemplo 8

Para la mayoría de las aplicaciones de fluorescencia, es necesario evitar o bloquear la luz ambiental porque su intensidad es varios órdenes de magnitud más fuerte que la intensidad de la luz de fluorescencia que emerge del tinte fluorescente. La luz ambiental puede provenir del sol y pasar a través de las ventanas hacia el objeto o puede ser emitida por las luces de la habitación. En los sistemas actuales de última generación, el entorno es oscuro para evitar la señal intensa de la luz ambiental en los canales de fluorescencia. Como alternativa, las regiones de longitud de onda específicas de la luz ambiental, que pasarían por el filtro de emisión, pueden ser bloqueadas por filtros.

Desafortunadamente, estos filtros suelen ser muy caros y no es posible cubrir ventanas grandes o las luces de habitaciones con dichos filtros o simplemente no están disponibles para ninguna configuración espectral.

La tecnología que aquí se presenta describe una idea alternativa que permite la iluminación ambiental de la habitación y en la misma situación detectar la fluorescencia. Esta mejora tiene una importancia particular en la formación de imágenes de fluorescencia quirúrgica durante la cirugía abierta.

Se presentan dos opciones diferentes. Ambas opciones funcionan con fuentes de luz pulsada como iluminación ambiental. En el primer método/realización, toda la luz en la ruta de formación de imágenes se bloquea durante el registro (referida en las reivindicaciones como "mantener el registro") de un fotograma, y el segundo método/realización utiliza los tiempos muertos de la agrupación de sensores entre fotogramas para iluminación ambiental.

Ejemplo 8 A

La iluminación de las luces de habitación se pulsa a una frecuencia alta en comparación con la percepción de frecuencia máxima del ojo humano (por ejemplo, a 200 Hz). La duración (ciclo de trabajo) de los pulsos es típicamente una pequeña fracción de todo el período (por ejemplo, 5-20% del período, típicamente 0,1-5 ms) lo que permite un tiempo de exposición más largo para las imágenes de fluorescencia como se muestra en la Figura 27. La ruta de luz para obtener de señales de fluorescencia de formación de imágenes se bloquea durante los pulsos de la luz de la iluminación ambiental. La figura muestra las fases del sistema de formación de imágenes y la temporización respectiva del dispositivo obturador para permitir la iluminación ambiental.

En una realización mostrada en la Figura 28 se proporciona una fuente de luz de iluminación de habitación/iluminación ambiental 902, cuya luz se acopla en la ruta de luz de excitación. Además, en la ruta de formación de imágenes. se proporciona un obturador 900 adicional. En esta realización, el obturador se coloca delante de la lente de objetivo del sistema óptico 200 por razones de simplicidad. Sin embargo, también se puede colocar en otra posición de la ruta. Alternativamente, el dispositivo obturador 900 puede incluirse en la ruta de formación de imágenes directamente delante de las agrupaciones de sensores. Tanto el obturador 900 como la iluminación de habitación 902 se controlan desde la unidad de control/procesamiento 300.

Cuando el obturador 900 está cerrado, bloquea toda la luz para que no entre en la ruta de formación de imágenes/detección y, por lo tanto, la luz no llega a la agrupación de sensores en el sistema de sensores 200. La frecuencia de funcionamiento de la iluminación ambiental de la fuente 902 no se adapta necesariamente a la frecuencia de funcionamiento del sistema de formación de imágenes por fluorescencia. Es preferible que el sistema de formación de imágenes funcione a 30-60 Hz para generar un flujo fluido de imágenes de fluorescencia y reflectancia para el ojo humano. La iluminación ambiental 902 se opera preferiblemente con una frecuencia que es más alta para que el ojo humano no perciba ningún parpadeo en el ambiente de la habitación.

Preferiblemente, la frecuencia de funcionamiento del sistema de iluminación ambiental 902 es un armónico más alto de la frecuencia de la formación de imágenes. En este caso, cada imagen tomada secuencialmente está igualmente influenciada por la ruta de formación de imágenes cerrada. Pero también sería posible detectar la temporización de la iluminación ambiental y corregir digitalmente los datos de formación de imágenes para la influencia de la ruta de formación de imágenes con obturación ligeramente diferente si fuera necesario.

El obturador 900 puede ser cualquier dispositivo electromecánico que pueda permitir o bloquear la propagación de la luz a lo largo de la ruta de haz. En una realización preferida, la luz ambiental y la ruta de formación de imágenes ópticas 903 son obturadas por una rueda troceadora de haz 901 como se muestra en la Figura 29 al rotar a la mitad de la frecuencia del efecto de obturador.

Las ruedas troceadoras 901 son una buena opción para interrumpir rutas de formación de imágenes con una cierta frecuencia y normalmente funcionan a frecuencias más altas en comparación con los obturadores ópticos. Alternativamente, una rueda troceadora puede ser intercambiada por diferentes dispositivos como un modulador electroóptico, SLM o moduladores acústicoópticos para mantener el registro de la imagen haciendo que la ruta sea opaca. En otra alternativa, la ruta se cierra utilizando filtros de polarización y utilizando dispositivos electrónicos con una transmisión de luz sensible a la polarización variable. Esto también permite bloquear eficazmente la ruta de formación de imágenes.

La fuente de luz puede ser cualquier tipo de fuente de luz ambiental que pueda funcionar con pulsos cortos. La fuente de luz 902 preferiblemente consiste en ledes pulsados electrónicamente. Dichos ledes son muy adecuados para la iluminación ambiental de un quirófano y pueden pulsarse con mucha precisión y a una frecuencia muy alta en comparación con la frecuencia del ojo humano.

Ejemplo 8 B

Una realización alternativa como se muestra en la Figura 30 utiliza una fase adicional (tercera fase) de luz de iluminación de una fuente de luz diferente siempre entre las fases 1 y 2 de la configuración de formación de imágenes para la iluminación ambiental. Esta fase se ejecuta al doble de frecuencia que las otras fases. La fuente de luz puede

ser independiente similar a la fuente de luz 902 o estar incluida en la fuente de luz 100 del sistema de iluminación. La luz emitida por esta fuente de luz no se utiliza necesariamente para la formación de imágenes, pero se puede utilizar principalmente para mejorar la percepción visual del ojo humano en el objeto y/o el entorno circundante.

- 5 En la realización básica, la iluminación del área de formación de imágenes se optimiza únicamente para la detección de componentes de imagen y el procesamiento de imagen, y en particular para la desmezcla de los diferentes fluoróforos. Normalmente, tal iluminación no es óptima para la impresión visual de un cirujano y puede resultar en un bajo contraste de imagen y una impresión visual no natural. Sin embargo, la distribución espectral y la intensidad de la tercera fase de iluminación adicional son libres para optimizar la percepción visual general y el brillo para el usuario (cirujano y personal médico en el quirófano) tal como se percibe acumulativamente para todas las fases de iluminación.
- 10 Los pulsos de iluminación en la 3ª fase son lo suficientemente cortos como para caber en el tiempo muerto de los sensores de formación de imágenes entre las dos fases, como se muestra en la Figura 30. Por lo general, se producen tiempos muertos cuando se transfieren datos desde el sensor 200 a la unidad de control 300. Por tanto, se requieren pulsos cortos de luz ambiental con alta precisión. Si el sistema de formación de imágenes funciona a una frecuencia de 30 Hz, la iluminación ambiental pulsada puede funcionar al doble de esta frecuencia, es decir, 60 Hz. Si la
- 15 iluminación ambiental debe consumir un ciclo de trabajo del 1%, la anchura de pulso de los pulsos debe ser del orden de 170 μ s. Si la iluminación ambiental consume un ciclo de trabajo del 5%, la fase de iluminación adicional proporciona un campo más brillante y la duración de la iluminación ambiental pulsada es de 800 μ s.

Ejemplo 9

- 20 En las descripciones anteriores, el concepto de un sistema de multiplexación espectral y temporal combinado se describe utilizando la iluminación de un objeto con dos fases diferentes. No obstante, la invención puede extenderse a otras fases en escenarios de formación de imágenes más elaborados. Estos permiten, por ejemplo, adquirir información espectral adicional sobre las imágenes de reflexión y/o de fluorescencia. En la siguiente sección, se describirán en detalle ejemplos adicionales de sistemas de múltiples fases.

Ejemplo 9A

- 25 En la Figura 31 se describe un método que funciona en 4 fases con 4 fuentes de luz. Este ejemplo tiene cuatro fuentes de luz diferentes 110, 120, 130 y 140 y un sistema de formación de imágenes 200 que transmite la luz en múltiples bandas. Los respectivos ejemplos de espectros de emisión de las fuentes de luz así como la transmisión de luz en el sistema de formación de imágenes (detección) 200 se muestran en la Figura 32. El perfil espectral de las cuatro luces
- 30 consiste en múltiples bandas espectrales. Las bandas espectrales de la luz 1 y 2 coinciden con las bandas de atenuación espectral del sistema de formación de imágenes, mientras que las bandas espectrales de las luces 3 y 4 coinciden con las bandas de transmisión del sistema de formación de imágenes. Como se muestra en la Figura 33 (curso temporal de la iluminación) la muestra se ilumina secuencialmente en 4 fases por las cuatro fuentes de luz 110, 120, 130 y 140. En cada fase, una luz ilumina el objeto 400. En este ejemplo particular, la luz 1 y la luz 2 excitan la
- 35 fluorescencia después. El filtro en el sistema de formación de imágenes atenúa las luces de excitación reflejadas, mientras transmite la emisión de fluorescencia, y se forman imágenes de emisión de fluorescencia a partir de la iluminación con la primera luz y la segunda luz. Posteriormente, el objeto 400 se ilumina con las luces 3 y 4. Las luces 3 y 4 son reflejadas por el objeto y se transmiten a través del sistema de formación de imágenes para formar la luz reflejada. En total se registran 4 imágenes, cada una procedente de cada fase de iluminación. Las dos imágenes de fluorescencia (cuando se iluminan con las luces 1 y 2) son combinadas por la unidad de procesamiento 300 para
- 40 formar una imagen de fluorescencia compuesta que se procesa para desmezclar espectralmente los componentes de fluorescencia y las dos imágenes de reflectancia (cuando se iluminan con las luces 3 y 4) son combinadas por la unidad de procesamiento 300 para formar una imagen de reflectancia compuesta que se procesa para desmezclar espectralmente los componentes de reflectancia.

- 45 Suponiendo que cada sensor tiene 3 canales de detección (por ejemplo, una cámara RGB estándar), después de completar 4 fases, el sistema registra imágenes de reflectancia combinadas de 6 canales e información de fluorescencia combinada de 6 canales.

- Existen diversas alternativas del método de multiplexación espectral multifase. El perfil espectral de cada luz no necesita estar separado espectralmente de los adyacentes, pero puede haber una superposición espectralmente
- 50 parcial, pero no siendo el mismo. La única condición necesaria es que las luces designadas para excitar la fluorescencia no deben tener un componente espectral dentro de la banda de transmisión del sistema de formación de imágenes 200. Además, no tienen que ser operadas secuencialmente, cualquier orden es posible. Otra alternativa puede tener diferentes combinaciones de luces para excitación. Por ejemplo, cuando se usa una luz para fluorescencia y tres para reflectancia con un sensor RGB, es posible combinar las imágenes de fluorescencia y descomponerlas en 3 componentes de fluorescencia y 9 componentes de reflectancia. O cuando se utilizan dos luces para fluorescencia
- 55 y una para reflectancia, es posible combinar las imágenes y descomponerlas en 6 componentes de fluorescencia y 3 componentes de reflectancia.

Ejemplos 10

El método y el sistema de formación de imágenes multispectrales se pueden implementar integrándolo en diversos

instrumentos de formación de imágenes. En una primera realización mostrada en la Figura 34A se utiliza un sistema de formación de imágenes multiespectrales con una lente de zoom 291 como lente de objetivo uniendo el detector 200 con un adaptador de cámara. El sistema de iluminación 100 entrega la luz al objeto con una guía de luz.

5 En otra realización mostrada en la Figura 34B, el sistema de detección 200 se conecta al puerto de vídeo de un microscopio quirúrgico 292 y el sistema de iluminación 100 se conecta con una guía de luz al puerto de iluminación para iluminar el objeto a través de la lente de objetivo del microscopio.

En una realización adicional mostrada en la Figura 34C, el sistema de detección 200 se conecta al puerto de ocular de un endoscopio rígido opcionalmente con el uso de un adaptador y el sistema de iluminación 100 se conecta con una guía de luz al puerto de iluminación.

10 En una realización adicional mostrada en la Figura 34D, el sistema de detección 200 está miniaturizado e integrado en la punta de un endoscopio flexible, mientras que el sistema de iluminación 100 se une al puerto de iluminación del endoscopio.

15 En incluso otra realización mostrada en la Figura 34E, el sistema de detección 200 se conecta al puerto de cámara de un fibroscopio flexible, que transfiere la imagen desde su punta a su punto distal con el uso de un fardo de fibra flexible, y el sistema de iluminación 100 se conecta al puerto de iluminación.

Ejemplo 11

A continuación se describen varias posibles aplicaciones del presente método inventivo.

a) Escenario de aplicación: formación de imágenes de oxigenación sanguínea:

20 En el siguiente ejemplo, se forman imágenes de la saturación de oxígeno al evaluar la concentración relativa de hemoglobina oxigenada a desoxigenada (HbO y Hb) en el tejido. Dado que la HbO y la Hb tienen espectros de absorción distintos, como se muestra en la Figura 35, la luz reflejada lleva información de perfil espectral que se puede registrar en el sistema. Al desmezclar espectralmente los múltiples componentes de reflectancia, es posible generar a) una imagen RGB que se expondrá en un sistema de visualización b) un mapa adicional de la biodistribución de los componentes HbO y Hb. Los mapas de saturación de oxígeno se calculan mediante la relación entre la HbO y la saturación total de hemoglobina.

b) Escenario de aplicación: Detección de lesiones cancerosas, características anatómicas o afecciones funcionales

30 Otra aplicación prevista, que no forma parte de la invención reivindicada, es utilizar el sistema para visualizar la biodistribución de agentes de contraste fluorescentes inyectables para la formación de imágenes de diagnóstico clínico in vivo. Estos agentes de contraste fluorescentes pueden ser no dirigidos, como Fluorescina o Indocianina Verde para resaltar la vascularización, perfusión sanguínea, etc., o dirigidos de una manera que puede resaltar con enfermedades de fluorescencia, como cáncer, afecciones médicas, como inflamación o características anatómicas, como los nervios o los ganglios linfáticos, mediante la unión a sitios moleculares asociados con una actividad funcional o patológica relativa en el tejido. Un ejemplo son es la formación de imágenes de los tumores de glioblastoma durante la cirugía cerebral, utilizando 5-ALA, un compuesto que induce la producción de protoporfirina en las células cancerosas. Estas aplicaciones pueden implicar la integración del método inventado en sistemas de formación de imágenes médicas como microscopios quirúrgicos, endoscopios, laparoscopios, gastroscopios, broncoscopios, oftalmoscopios, cámaras de fondo de ojo, etc.

c) Escenario de aplicación: formación de imágenes de varios indicadores

40 De particular interés, que no forma parte de la invención reivindicada, es la aplicación de la tecnología de formación de imágenes multiespectrales en tiempo real descrita en aplicaciones clínicas que utilizan enfoques de diagnóstico de indicador dual. El uso de dos o más sondas fluorescentes puede proporcionar información diversa sobre diferentes biomarcadores para acceder al estado patológico o funcional del tejido. La combinación de las biodistribuciones de diferentes agentes, que vienen como componentes de imagen después de la desmezcla, puede mejorar la visualización de un objetivo del que se van a formar imágenes, es decir, una lesión, aumentar la sensibilidad de detección y la especificidad de una característica patológica.

d) Escenario de aplicación: Inspección de máquina

50 Un escenario de aplicación adicional previsto de formación de imágenes de fluorescencia multiespectral en tiempo real está en la inspección de máquina. Un motor o partes mecánicas que son difíciles de inspeccionar visualmente, como engranajes, debido a que están encerrados internamente, pueden tener daños como pequeñas grietas. Estos defectos estructurales se pueden visualizar después de lavar el interior del motor con una solución fluorescente y usar un endoscopio para inspeccionar internamente la ubicación de las grietas que retienen el fluido fluorescente. La formación de imágenes multiespectrales en tiempo real puede ofrecer imágenes de fluorescencia y reflectancia de color simultáneas.

e) Escenario de aplicación: tintes sensibles al pH

El entorno químico puede influir en la emisión o excitación de tintes fluorescentes. Uno de estos parámetros que cambia las características de absorción y emisión del tinte es el valor del pH.

Caso de tintes sensibles a las emisiones:

- 5 Es preferible tener las bandas de transmisión de los respectivos filtros optimizadas de manera que detecten la señal que sea espectralmente sensible a los cambios del valor de pH. También es preferible tener canales de detección, que dependen al máximo del valor del pH, mientras que otros son en su mayoría insensibles a los cambios en el valor del pH.

- 10 Esto se puede realizar, por ejemplo, ajustando las bandas de filtro de emisión de modo que el centro de las respectivas bandas de fluorescencia medidas coincida con un punto espectral donde el espectro de emisión del tinte varía al máximo en un cambio del valor de pH o en un punto espectral donde el espectro de emisión de tinte depende mínimamente del valor de pH.

Caso de tintes sensibles a la excitación:

- 15 Es preferible tener las bandas de excitación de los respectivos filtros y fuentes de luz optimizadas de manera que detecten la señal que sea espectralmente sensible a los cambios del valor de pH. También es preferible tener bandas de excitación de modo que algunos de los canales detectados dependan al máximo del valor de pH, mientras que otros canales sea en su mayoría insensibles a los cambios del valor de pH.

- 20 Las bandas de filtro de excitación deben ajustarse de manera que el centro de las respectivas bandas coincida con un punto espectral donde el espectro de excitación de tinte varía al máximo en un cambio del valor de pH o en un punto espectral donde el espectro de excitación de tinte depende mínimamente del valor de pH.

Las imágenes registradas se registran multiespectralmente, se desmezclan espectralmente y se procesan de tal manera que visualizan la distribución espacial de los valores de pH.

f) Escenario de aplicación: distinguir la zona de infiltración de tumor y la masa de tumor sólido por diferencias en el espectro de emisión de PPIX

- 25 Para el diagnóstico de tumores, se administra 5-ALA al paciente que conduce a una acumulación de protoporfirina IX (PPIX) en el tejido tumoral. La sustancia PPIX es tanto un tinte fluorescente como un agente para la terapia fotodinámica.

- 30 El espectro de emisión de fluorescencia del PPIX varía según la ubicación y el microambiente dentro del tumor. Más precisamente, la zona de infiltración exhibe un espectro de emisión de fluorescencia diferente en comparación con la masa tumoral sólida. Esta diferencia espectral se puede utilizar para diferenciar entre la masa tumoral y la zona de infiltración.

Con el sistema de la invención se pueden registrar y desmezclar dos espectros PPIX de picos diferentes con máximos a 620 nm y 635 nm.

Además, se pueden registrar otros fluoróforos y también la autofluorescencia.

- 35 g) Escenario de aplicación: Autofluorescencia

- 40 Una aplicación interesante es la detección espectral de la autofluorescencia intrínseca del tejido, es decir, la fluorescencia que se emite habitualmente sin administrar agentes de contraste fluorescentes p. ej. fluoróforos). La autofluorescencia intrínseca del tejido se atribuye a diversas moléculas que existen o se producen en los tejidos, como NADPH, flavinas, colágeno, elastina y otras. La existencia, producción, acumulación u otras propiedades de concentración están vinculadas con diversas características del tejido, como características anatómicas, funcionales y patológicas. La formación de imágenes multiespectrales de la autofluorescencia del tejido y la desmezcla espectral de los compuestos asociados pueden revelar rasgos o características del tejido que ayudan a la evaluación o al diagnóstico de una afección médica. La formación de imágenes multiespectrales y la desmezcla de la autofluorescencia pueden tener lugar junto con moléculas fluorescentes administradas sistémicamente.

- 45 h) Escenario de aplicación: Formación de imágenes de la retina

Se pueden formar imágenes de la retina a través del ojo. Actualmente esta modalidad de formación de imágenes se utiliza en la práctica clínica principalmente con fines diagnósticos de la propia retina.

- 50 El ojo proporciona una ventana clara a los vasos sanguíneos del cuerpo que miran directamente a los vasos retinianos. Con la formación de imágenes multiespectrales de la retina y la desmezcla espectral, es posible identificar moléculas fluorescentes que existen en la retina o que circulan en sus vasos sanguíneos. Estas moléculas fluorescentes pueden haber sido administradas sistémicamente, para circular libremente o dirigirse a células (posiblemente células

cancerosas metastásicas), microorganismos, virus o moléculas. La formación de imágenes multiespectrales y la desmezcla pueden identificar estas sustancias, que pueden proporcionar información sobre la circulación sanguínea en general, o la circulación de los objetivos, que pueden ayudar a evaluar la afección funcional o patológica del "paciente". Por lo tanto, es posible utilizar formación de imágenes de la retina para obtener información sobre la propia retina y también para obtener información sobre los compuestos que circulan en la sangre.

5 i) Escenario de aplicación: Cirugía robótica

Una aplicación interesante del aparato y sistema de formación de imágenes multiespectrales es combinarlo con un sistema robótico quirúrgico. En primer lugar, no formando parte de la invención reivindicada, puede proporcionar al cirujano que opera información visual multiespectral ya sea en el dominio de color de reflectancia, o en el dominio de (auto-) fluorescencia, sobre la anatomía, función o enfermedad del tejido. En un segundo nivel, que no forma parte de la invención reivindicada, puede proporcionar información que aumente la seguridad del funcionamiento del robot, por ejemplo, prohibiendo al médico dañar accidentalmente (es decir, cortar) tejido (por ejemplo, nervios). En un tercer nivel, que no forma parte de la invención reivindicada, puede proporcionar directamente información y/o retroalimentación a un procedimiento de cirugía robótica automatizada que tiene un control humano reducido o mínimo.

REIVINDICACIONES

1. Método para la adquisición de imágenes de fluorescencia y reflectancia de un objeto (400) que comprende las etapas de

iluminar alternativamente el objeto (400) con al menos una primera luz que tiene varias regiones espectrales de alta intensidad, en donde la primera luz tiene regiones de baja intensidad que son de mayor longitud de onda que las regiones de alta intensidad y en donde las regiones espectrales de alta intensidad de la primera luz y las regiones de baja intensidad de la primera luz se disponen alternando a lo largo del eje de longitud de onda espectral y al menos una segunda luz que tiene al menos una región espectral de alta intensidad y al menos una región espectral de baja intensidad que es de longitud de onda más larga a su región de alta intensidad,

en donde la relación de la intensidad de luz entre las regiones de alta intensidad a una longitud de onda más corta y las regiones de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para la primera luz es $\geq 1 \times 10^2$,

en donde la relación de la intensidad de luz entre las regiones de alta intensidad a una longitud de onda más corta y las regiones de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para la segunda luz es $\geq 1 \times 10^2$,

registrar una primera imagen del objeto durante la iluminación del objeto con la primera luz y una segunda imagen del objeto durante la iluminación del objeto con la segunda luz usando una agrupación de sensores común (200),

en donde la luz que se registrará como primera imagen o segunda imagen por la agrupación de sensores (200) se atenúa en las diversas regiones espectrales en las que la primera luz tiene alta intensidad con una cantidad de atenuación de la luz que será registrada por la agrupación de sensores (200) en las varias regiones espectrales en las que la primera luz tiene alta intensidad, de modo que, al iluminarse con la primera luz, la señal detectada en las varias regiones espectrales en las que la primera luz tiene baja intensidad es mayor que el traspaso de las regiones de la primera luz de la primera luz, donde la primera luz tiene alta intensidad.

2. Método según la reivindicación anterior, caracterizado por que la agrupación de sensores (200) es una agrupación multicanal, preferiblemente una agrupación de sensores de color en la que cada canal tiene una sensibilidad espectral distinta.

3. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los datos, que se proporcionan en el espacio de imagen de canal de las imágenes registradas, p. ej. espacio de imagen de color de un sensor de color, se transforman en valores de un espacio de imagen de componente, donde los componentes corresponden preferiblemente a las distribuciones espaciales de fluorocromos, absorbedores, valores derivados o ruido.

4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la relación de la intensidad de luz entre al menos una región de alta intensidad a una longitud de onda más corta y al menos una región de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para al menos una de las luces es $\geq 1 \times 10^3$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^6$

y/o

caracterizado por que la relación de atenuación entre la intensidad de las regiones espectrales no atenuadas y atenuadas es $\geq 1 \times 10^2$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^3$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^6$.

5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la luz registrada por la agrupación de sensores (200) es filtrada por un filtro de paso de banda múltiple (213).

6. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se genera la primera luz y/o la segunda luz

a) con luz de banda ancha, por ejemplo luz blanca, de dos fuentes de luz de banda ancha (111), en donde dichas luces de banda ancha son filtradas por filtros de paso de banda múltiple (112) para generar la primera luz y la segunda luz,

o

b) múltiples fuentes de luz de banda estrecha (121), preferiblemente diodos emisores de luz (LED), donde la luz que emana de la fuente de luz de banda estrecha se filtra opcionalmente mediante un filtro multibanda en la ruta de luz

o

c) una combinación de fuentes de luz de banda ancha según a) y fuentes de luz de banda estrecha según b).

7. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la imagen registrada durante la iluminación del objeto (400) con la segunda luz se procesa para corregirla para la región o regiones espectrales atenuadas.

8. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por iluminar alternativamente el objeto (400)

con al menos la primera luz, que tiene un primer período de iluminación, y la segunda luz, que tiene un segundo período de iluminación, y

iluminar el objeto (400) con pulsos de una luz adicional, en donde la duración de pulso de la luz adicional es corta en comparación con el primer período de iluminación y corta en comparación con el segundo período de iluminación, y manteniendo el registro de la primera imagen y la segunda imagen durante dicha iluminación con más luz.

o

iluminar alternativamente el objeto (400) con al menos la primera luz, que tiene un primer período de iluminación, la segunda luz, que tiene un segundo período de iluminación, y una tercera luz que tiene un tercer período de iluminación.

9. Aparato de formación de imágenes para la adquisición de imágenes de fluorescencia y reflectancia de un objeto (400) que comprende

al menos una primera fuente de luz (121) que proporciona una primera luz que tiene varias regiones espectrales de alta intensidad,

en donde la primera luz tiene regiones de baja intensidad que son de mayor longitud de onda que las regiones de alta intensidad y en donde las regiones espectrales de alta intensidad de la primera luz y las regiones de baja intensidad de la primera luz se disponen alternando a lo largo del eje de longitud de onda espectral, y al menos una segunda fuente de luz (111) que proporciona una segunda luz que tiene al menos una región espectral de alta intensidad y al menos una región espectral de baja intensidad que es de longitud de onda más larga a su región de alta intensidad, en donde la relación de la intensidad de luz entre las regiones de alta intensidad a una longitud de onda más corta y las regiones de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para la primera luz es $\geq 1 \times 10^2$,

en donde la relación de la intensidad de luz entre las regiones de alta intensidad a una longitud de onda más corta y las regiones de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para la segunda luz es $\geq 1 \times 10^2$, en donde la al menos una primera fuente de luz y la al menos una segunda fuente de luz se configuran para iluminar alternativamente el objeto (400) con al menos una primera luz y al menos una segunda luz,

una agrupación de sensores (200) dispuesta para registrar una primera imagen del objeto durante la iluminación del objeto con la primera luz y una segunda imagen del objeto durante la iluminación del objeto con la segunda luz, un atenuador (213) configurado para atenuar la luz que se registrará como primera imagen o segunda imagen por la agrupación de sensores en las varias regiones espectrales en las que la primera luz tiene alta intensidad con una cantidad de atenuación de la luz que será registrada por la agrupación de sensores (200) en las varias regiones espectrales en las que la primera luz tiene alta intensidad de modo que, al iluminarse con la primera luz, la señal detectada en las varias regiones espectrales en las que la primera luz tiene baja intensidad es mayor que el traspaso de las regiones de la primera luz, donde la primera luz tiene alta intensidad.

10. Aparato según la reivindicación anterior, caracterizado por que la agrupación de sensores (200) es una agrupación multicanal, preferiblemente una agrupación de sensores de color.

11. Aparato según una de las dos reivindicaciones anteriores configurado para transformar los datos, que se proporcionan en el espacio de imagen de canal de las imágenes registradas, p. ej. espacio de imagen de color de un sensor de color, en valores de un espacio de imagen de componente, donde los componentes corresponden preferiblemente a las distribuciones espaciales de fluorocromos, absorbedores, valores derivados o ruido.

12. Aparato según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la relación de la intensidad de luz entre al menos una región de alta intensidad a una longitud de onda más corta y al menos una región de baja intensidad de luz de una longitud de onda más larga para al menos una de las luces es $\geq 1 \times 10^3$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^6$

y/o

caracterizado por que la relación de atenuación entre la intensidad de las regiones espectrales no atenuadas y atenuadas es $\geq 1 \times 10^2$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^3$, preferiblemente $\geq 1 \times 10^6$.

13. Aparato según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por un filtro de paso de banda (213) o un filtro de paso de banda múltiple, colocado entre el objeto y la agrupación de sensores (200) para filtrar la luz registrada por la agrupación de sensores (200).

14. Aparato según una de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado por que el aparato se configura para procesar la imagen registrada durante la iluminación del objeto (400) con una segunda luz con el fin de corregirla para la región o regiones espectrales atenuadas.

15. Endoscopio o microscopio quirúrgico que comprende un aparato de formación de imágenes según una de las reivindicaciones 9 a 12.

16. Método según una de las reivindicaciones 1 a 8 o uso de un aparato según una de las reivindicaciones 9 a 14 o

uso de un endoscopio o microscopio quirúrgico según la reivindicación 15 para registrar imágenes de reflexión e imágenes de fluorescencia para inspección interna en aplicaciones de automoción y/o en análisis químico y/o físico.

Fig. 1

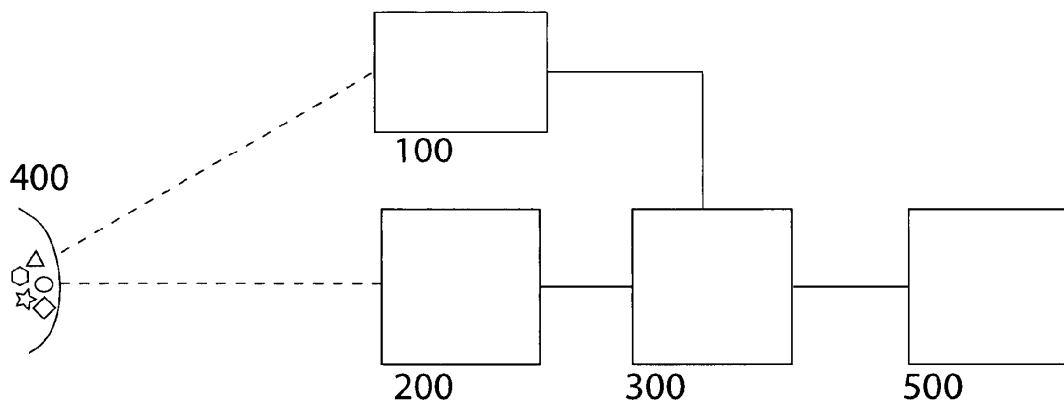


Fig. 2

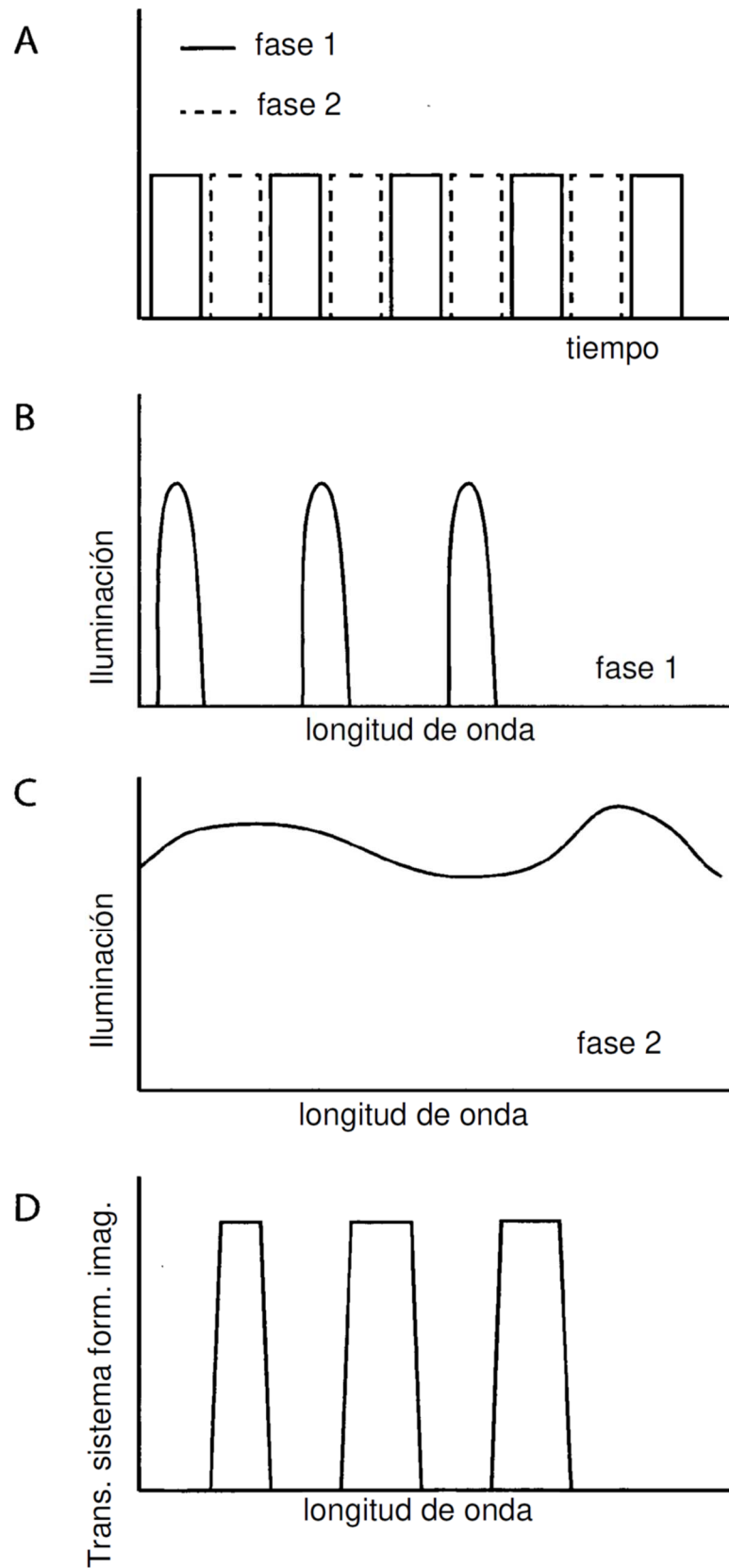


Fig. 3

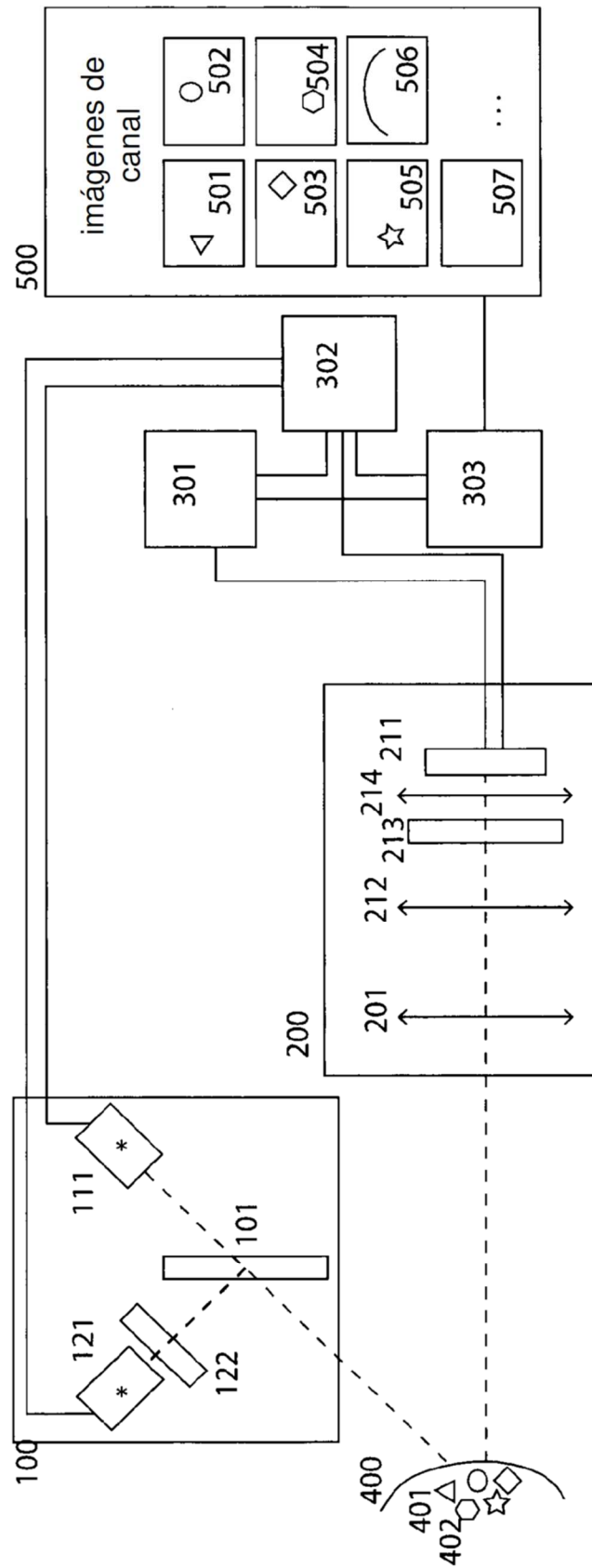


Fig. 4

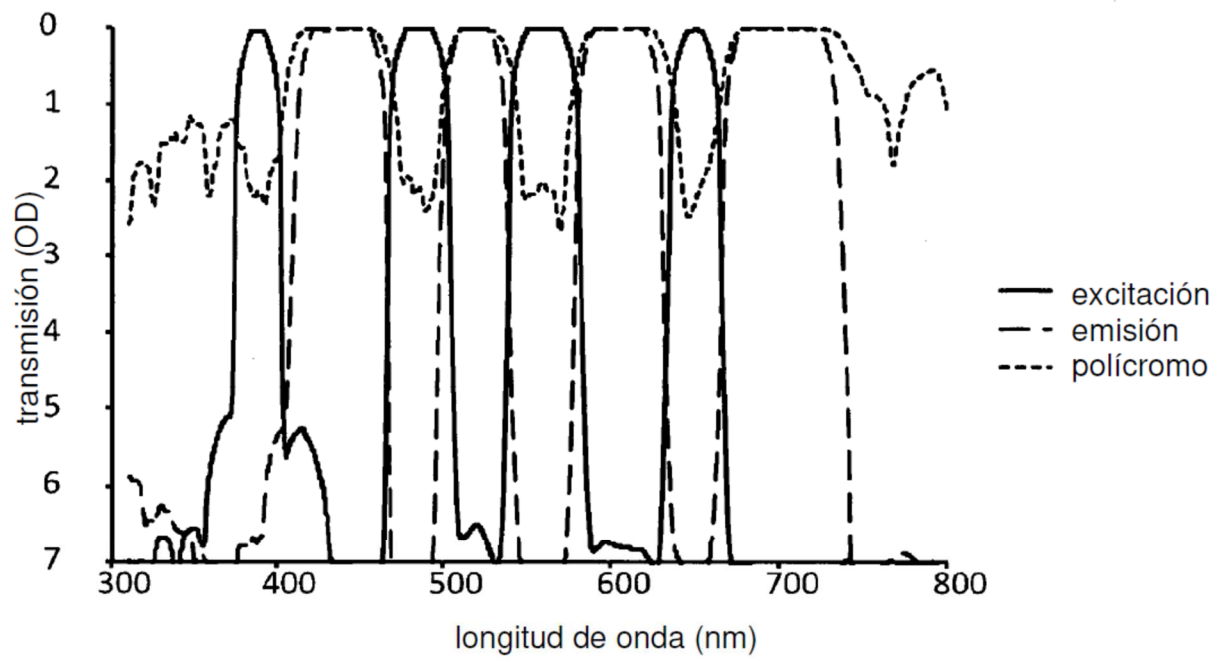


Fig. 5

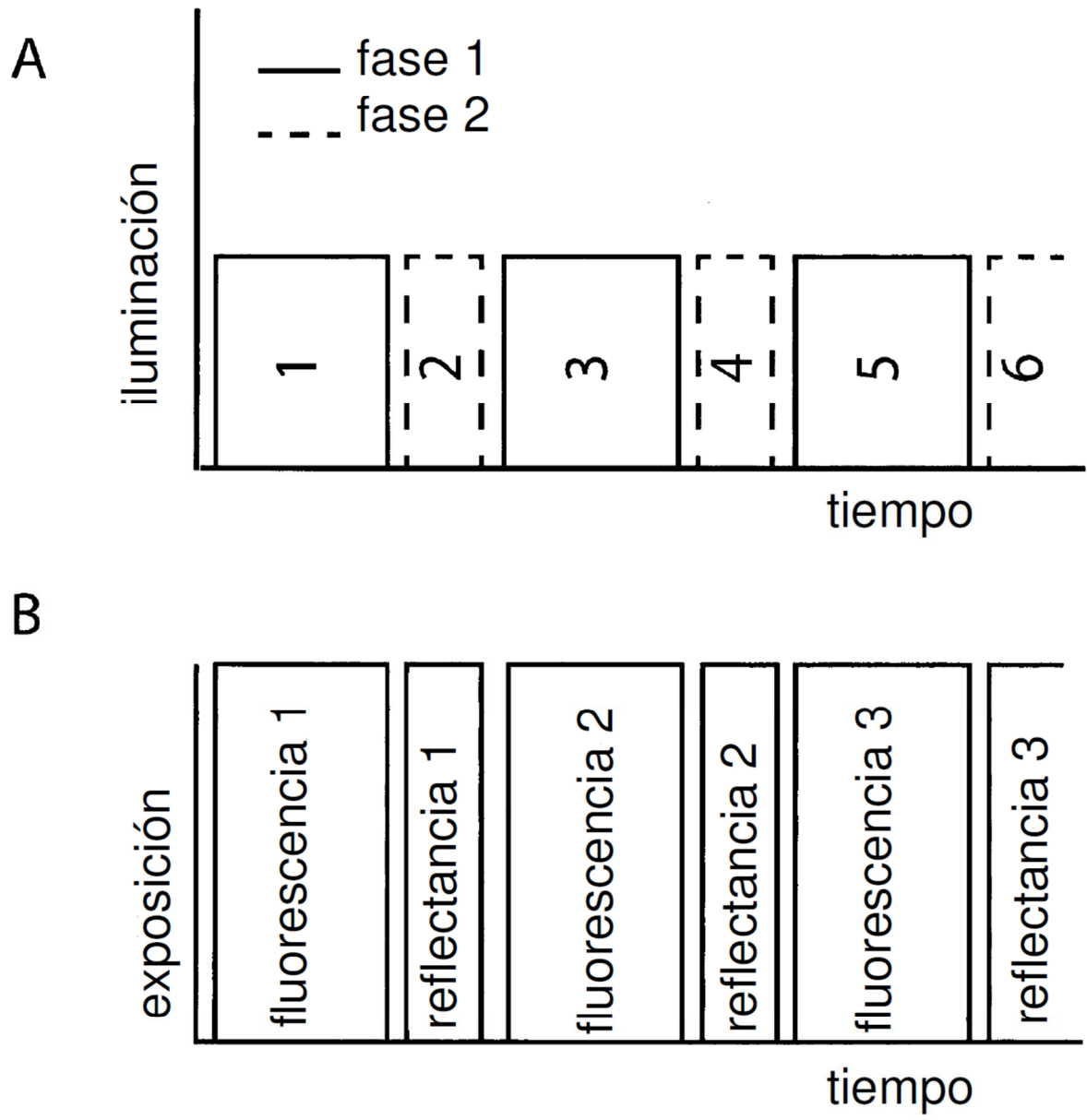


Fig. 6

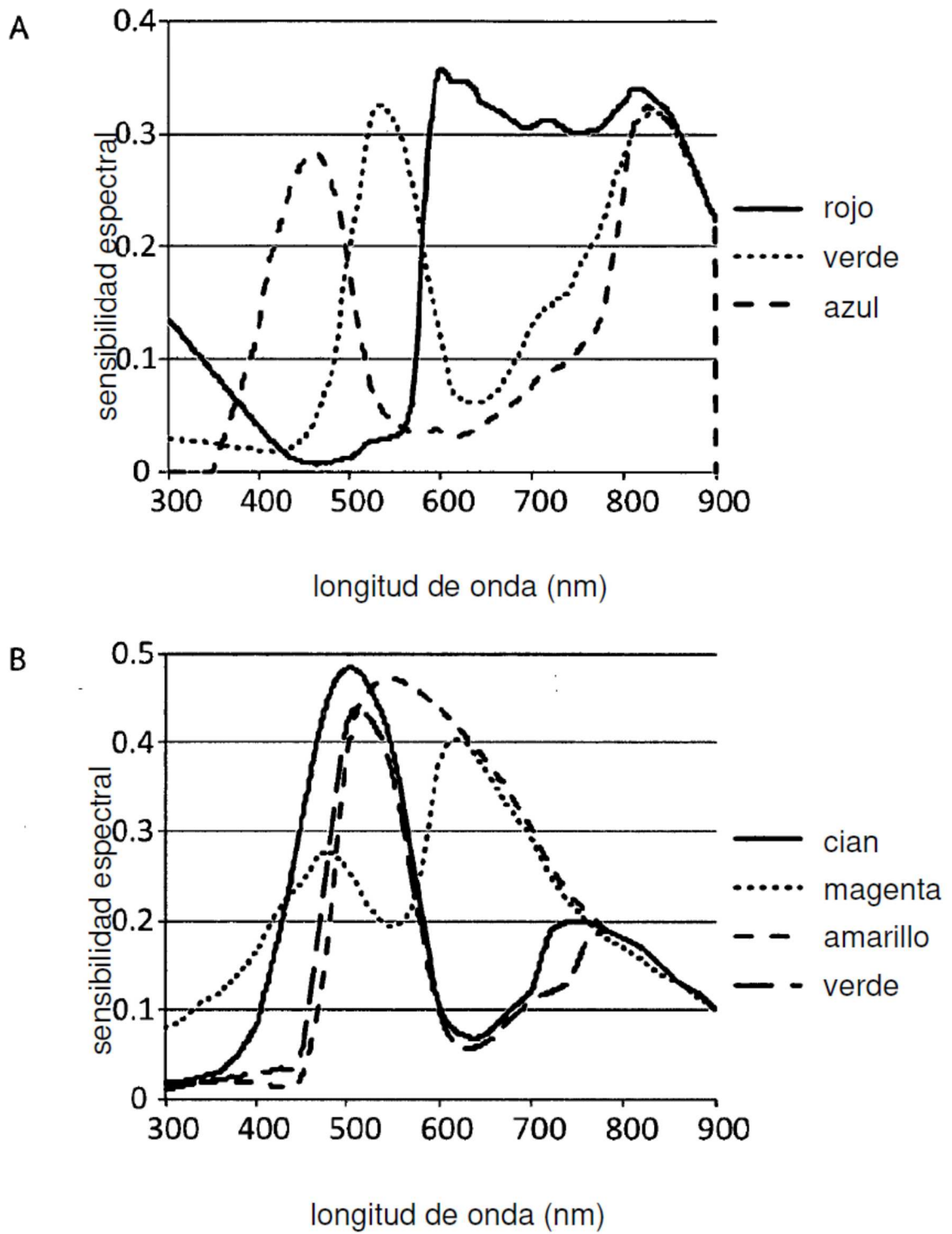


Fig. 7

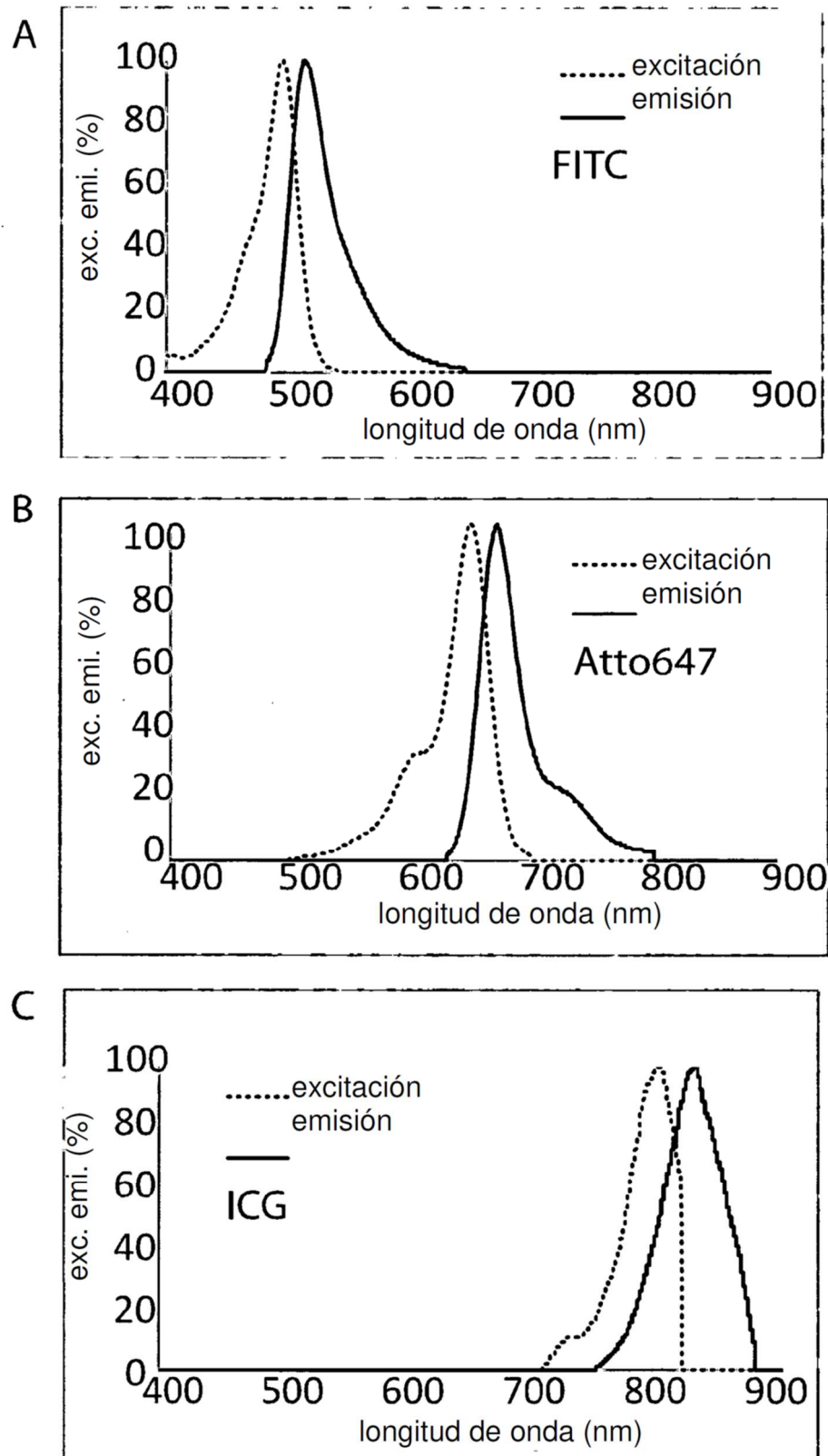


Fig. 8

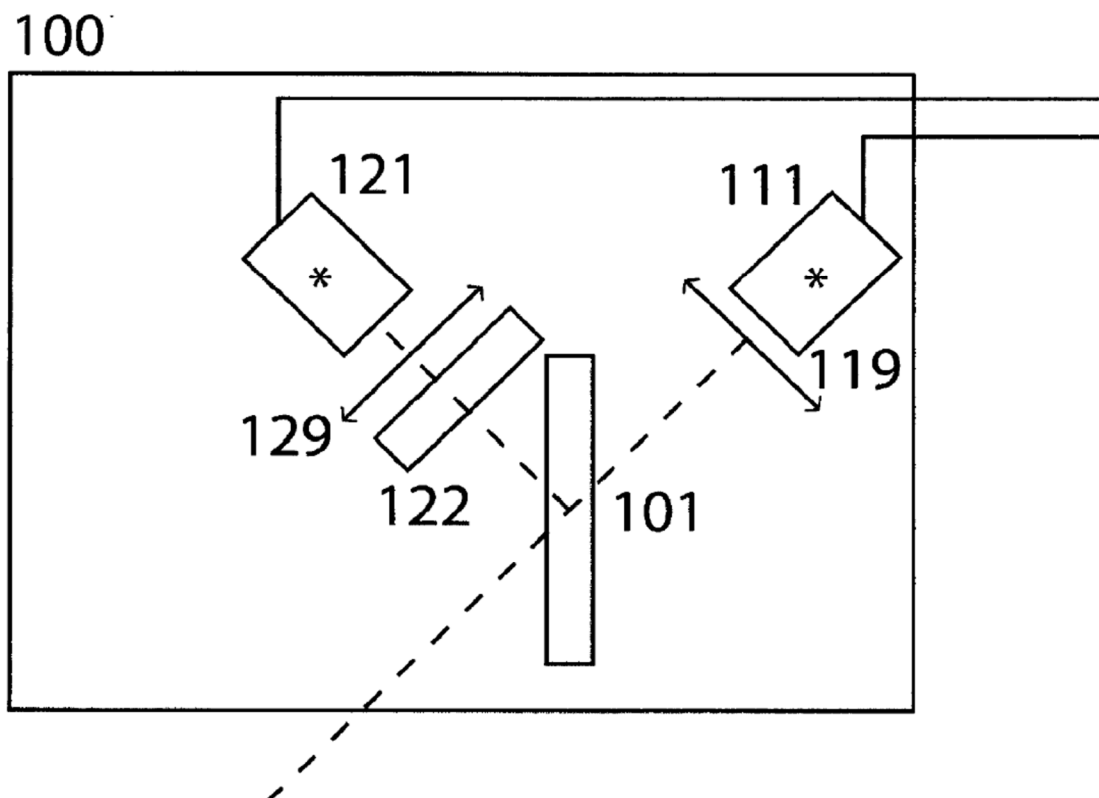
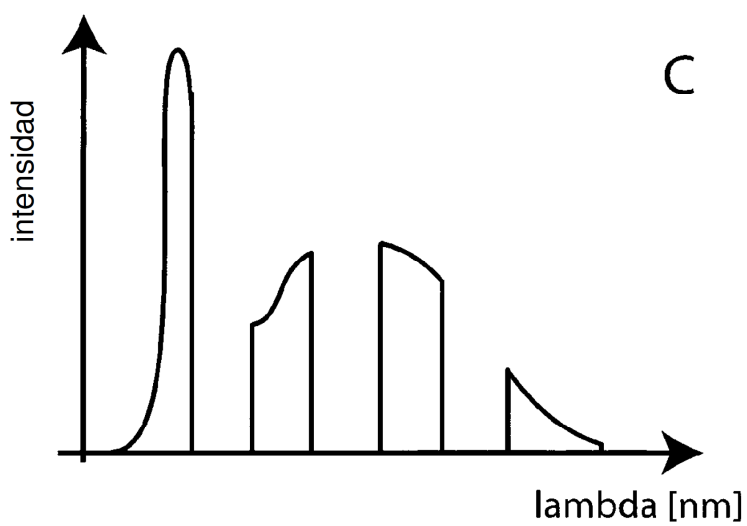
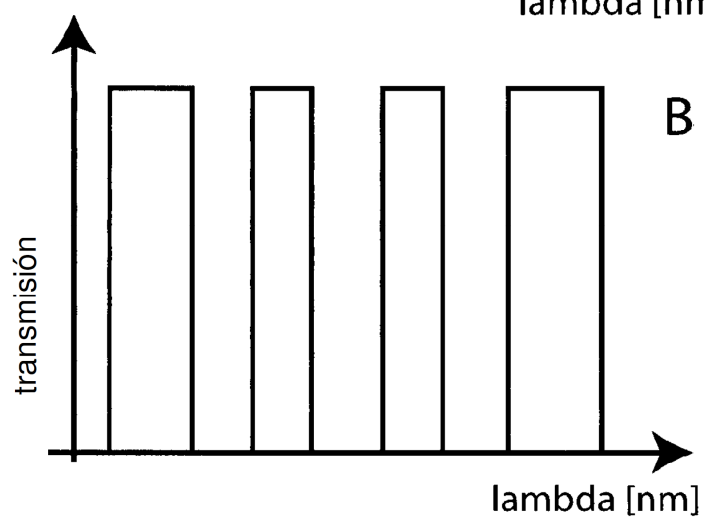
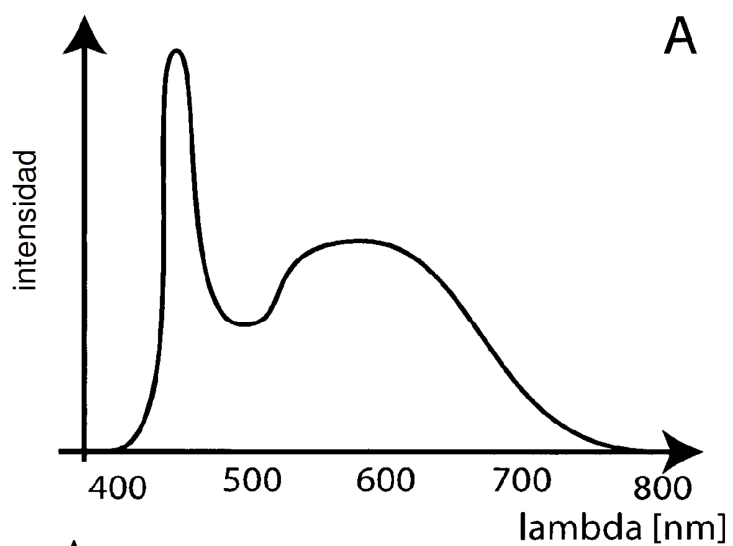


Fig. 9



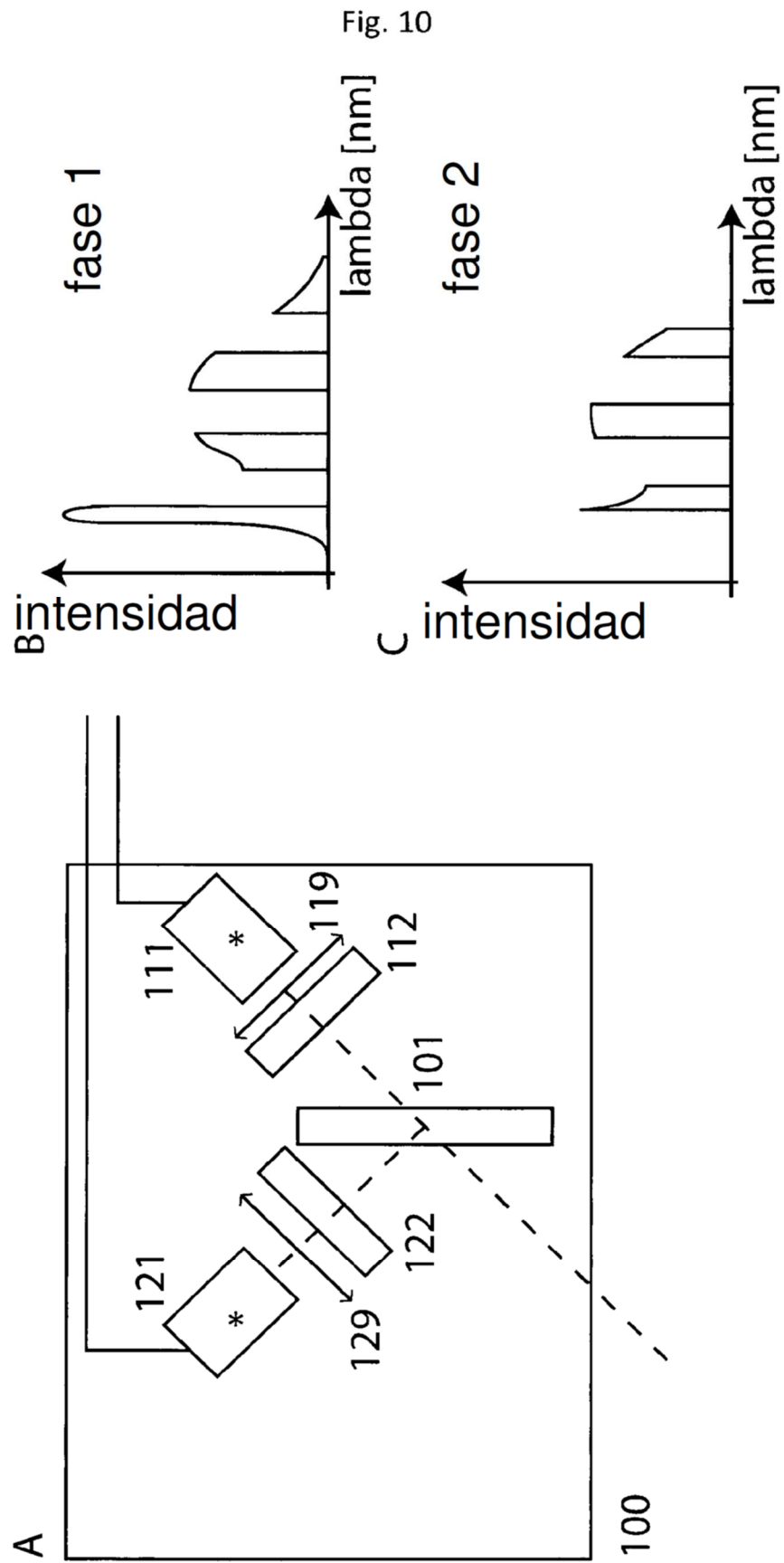


Fig. 11

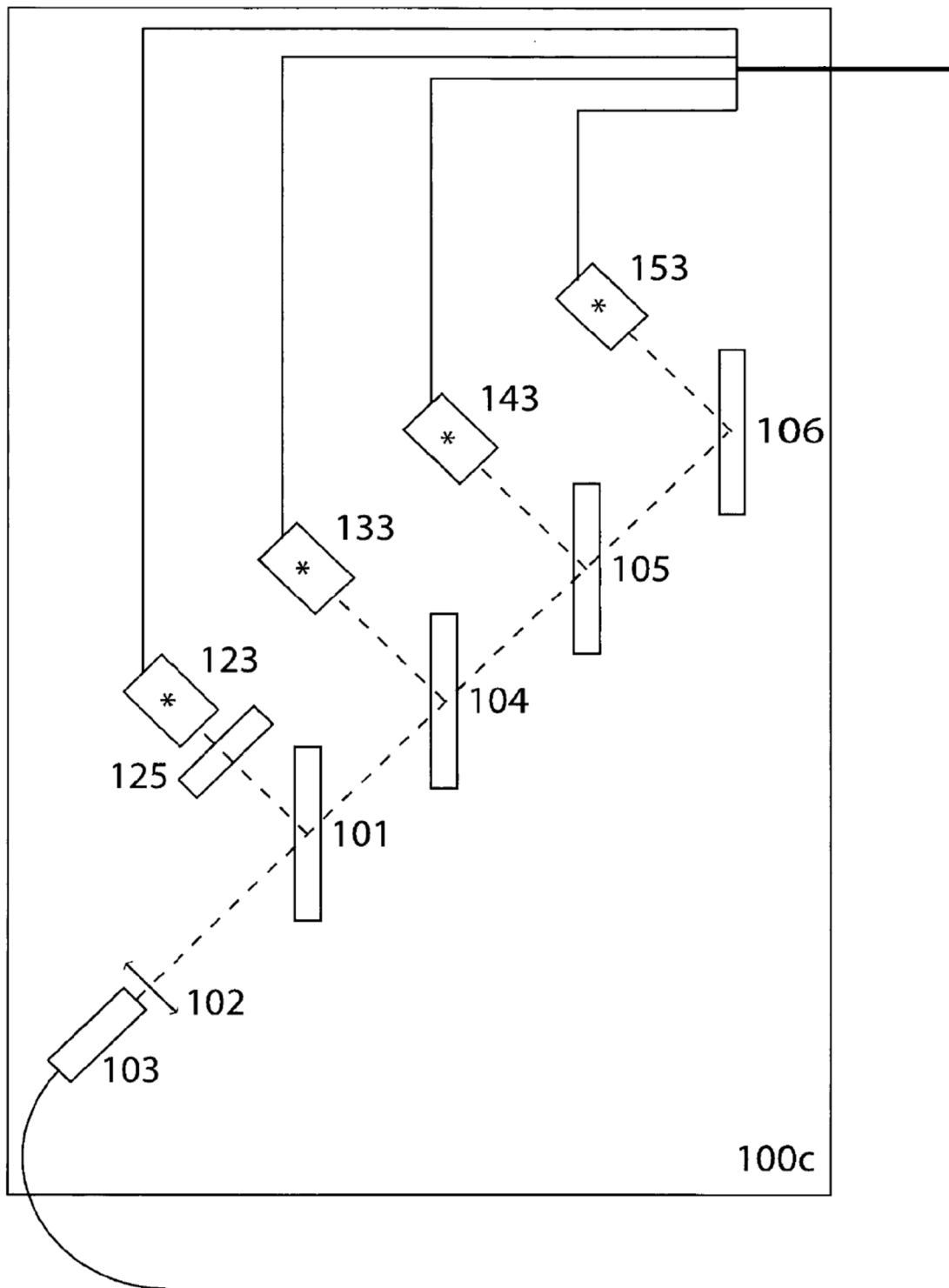


Fig. 12

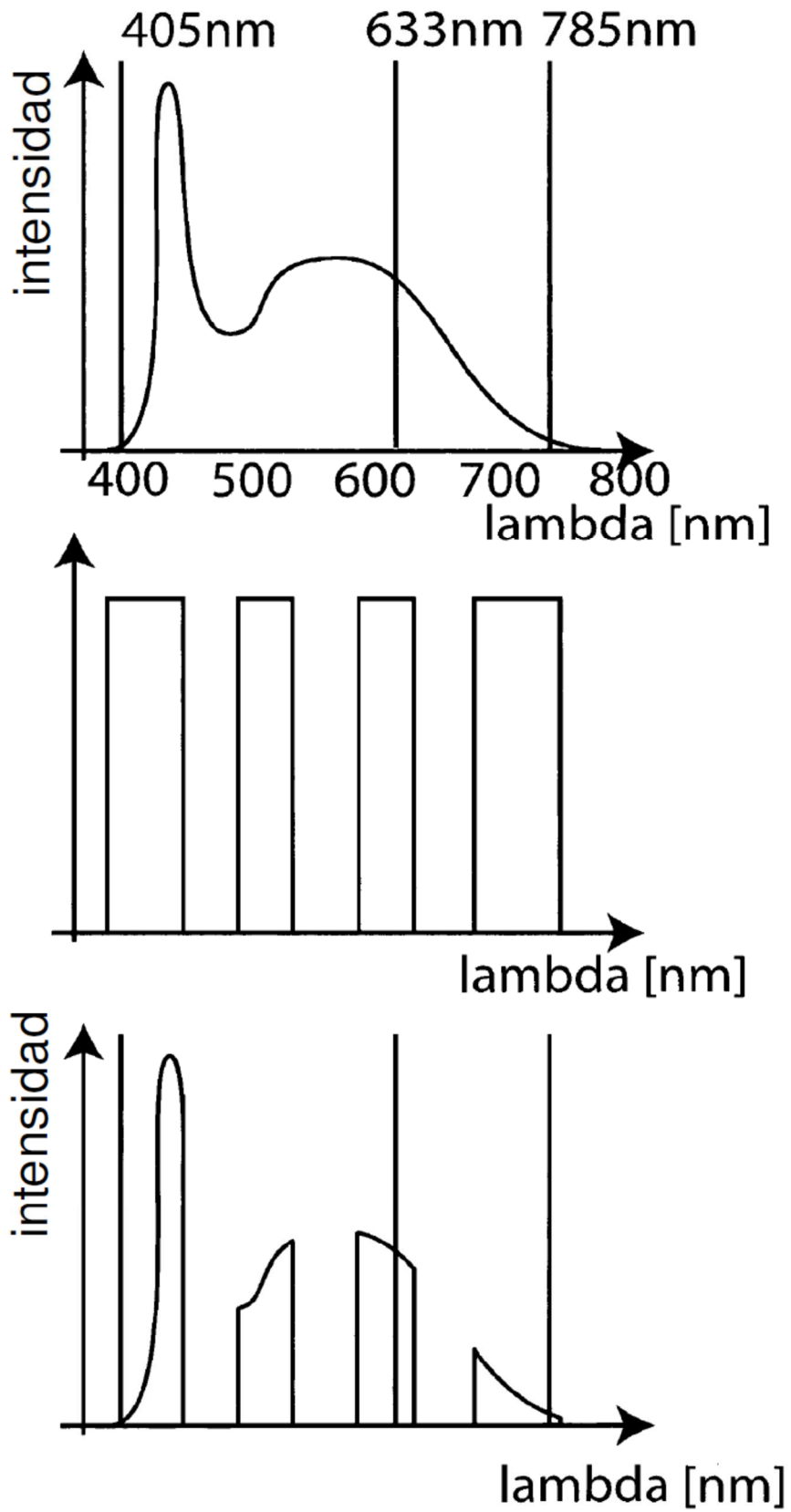


Fig. 13

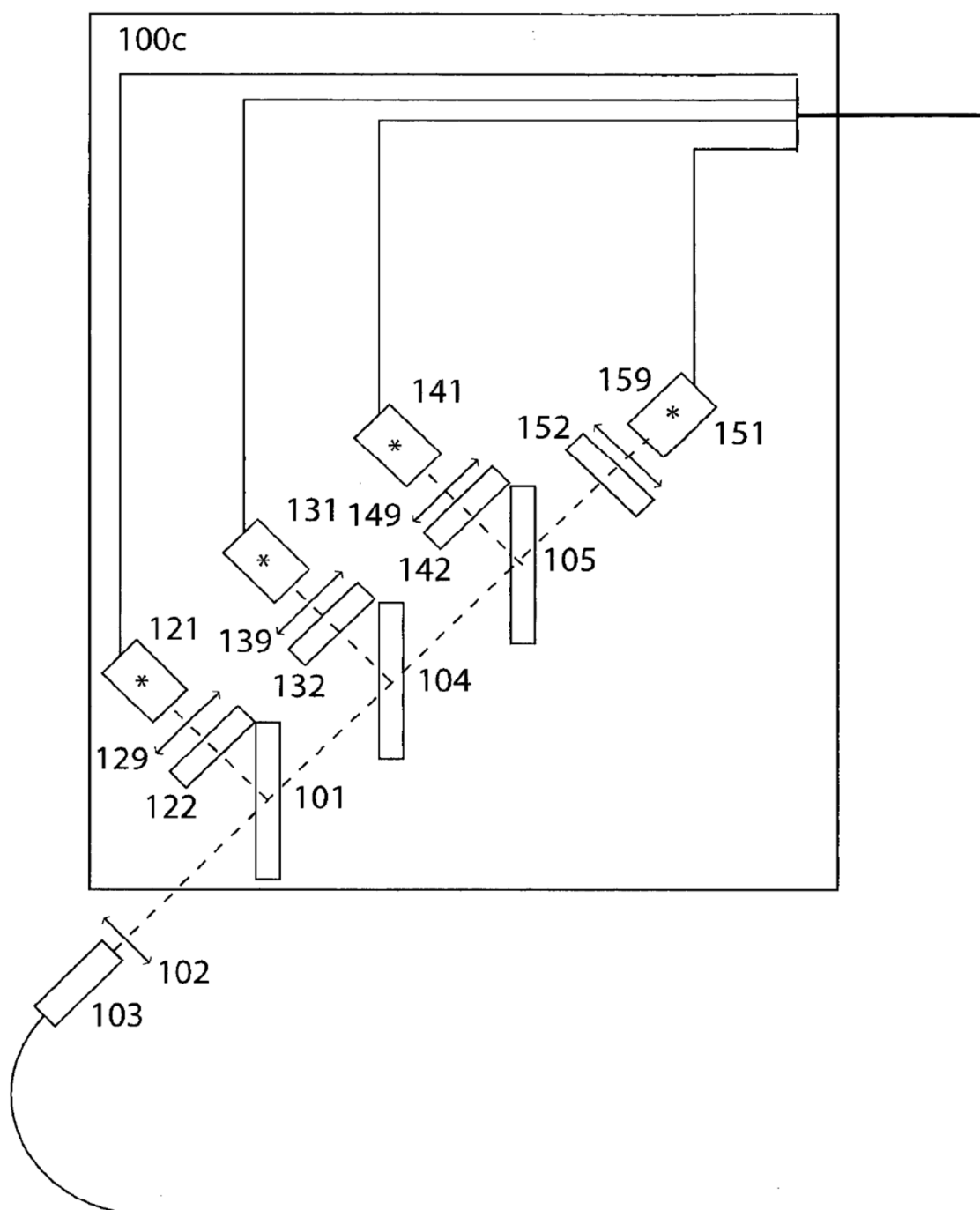


Fig. 14

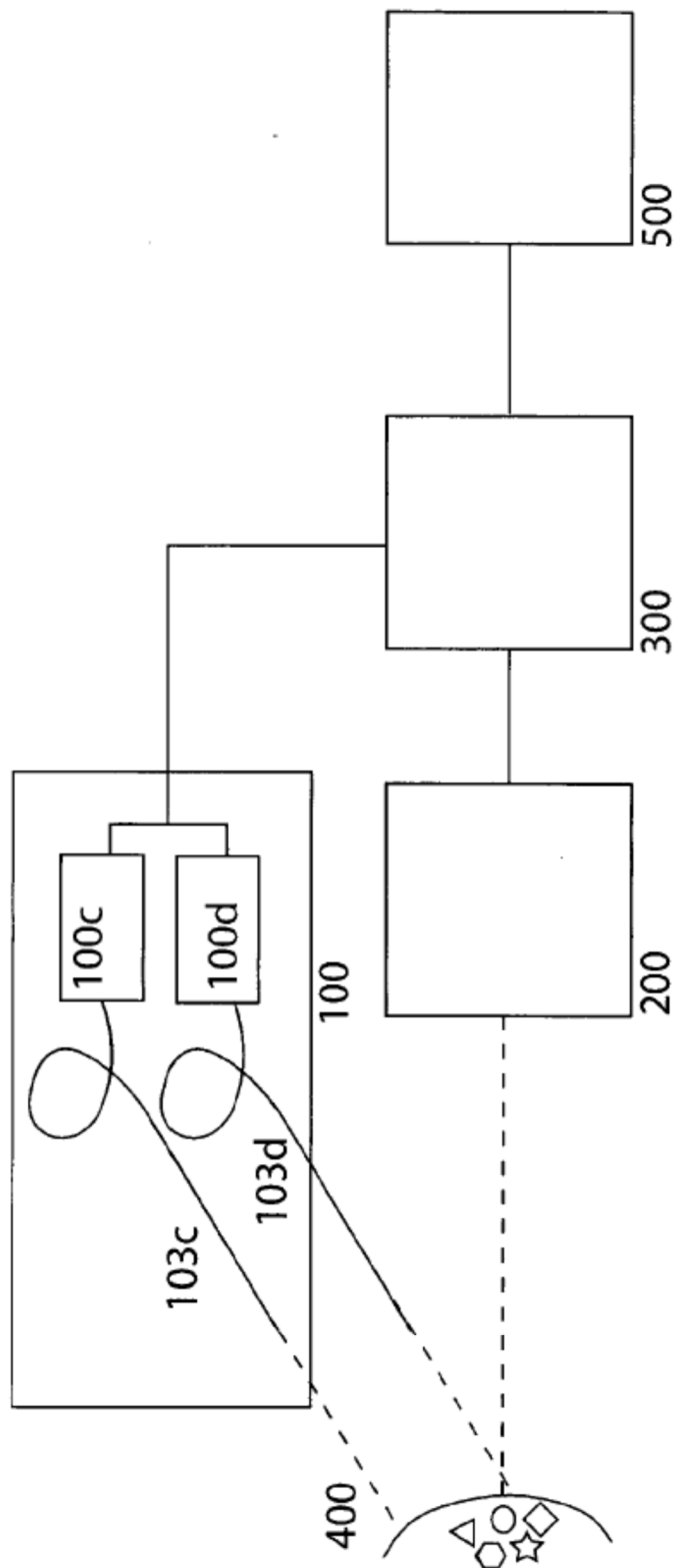


Fig. 15

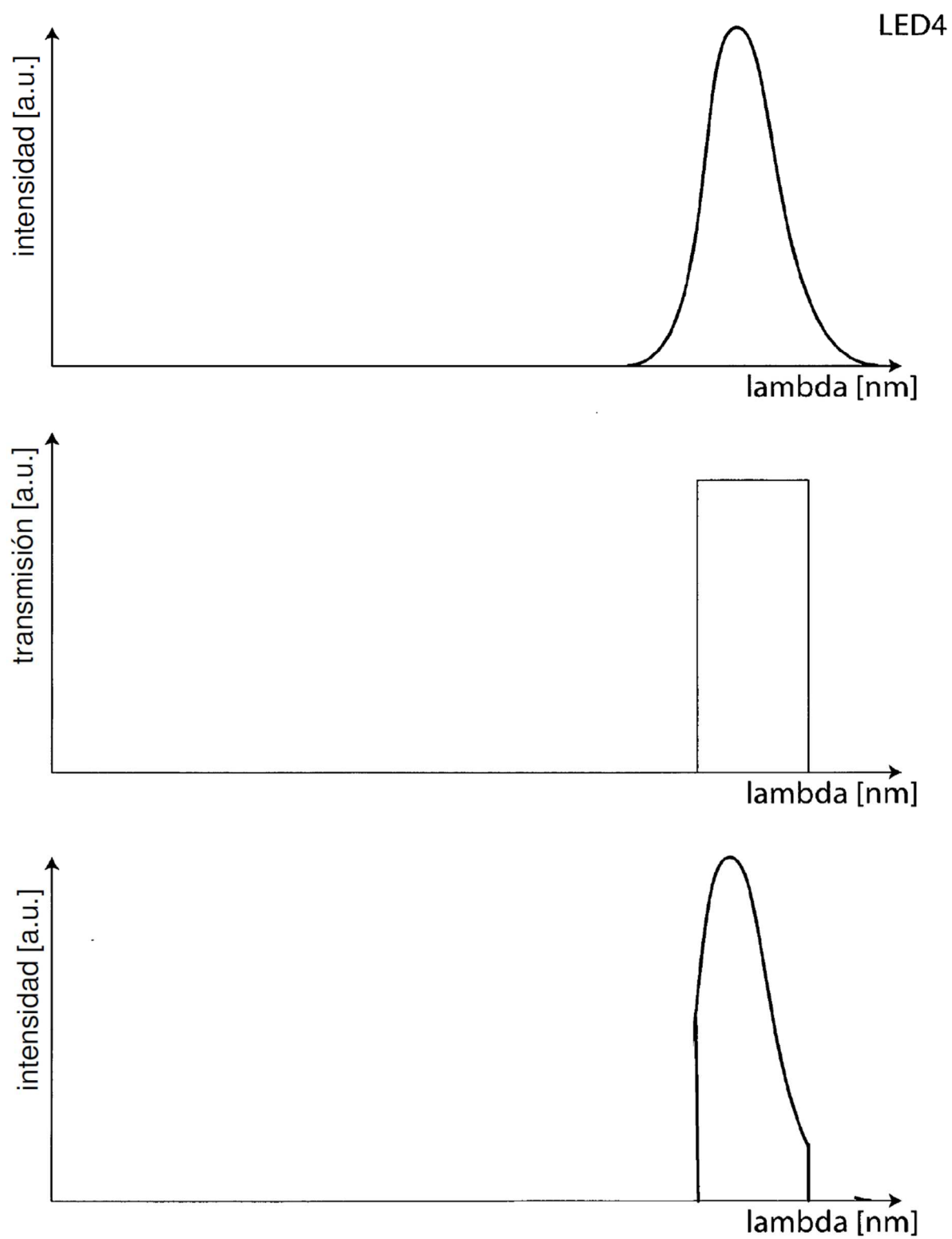


Fig. 16

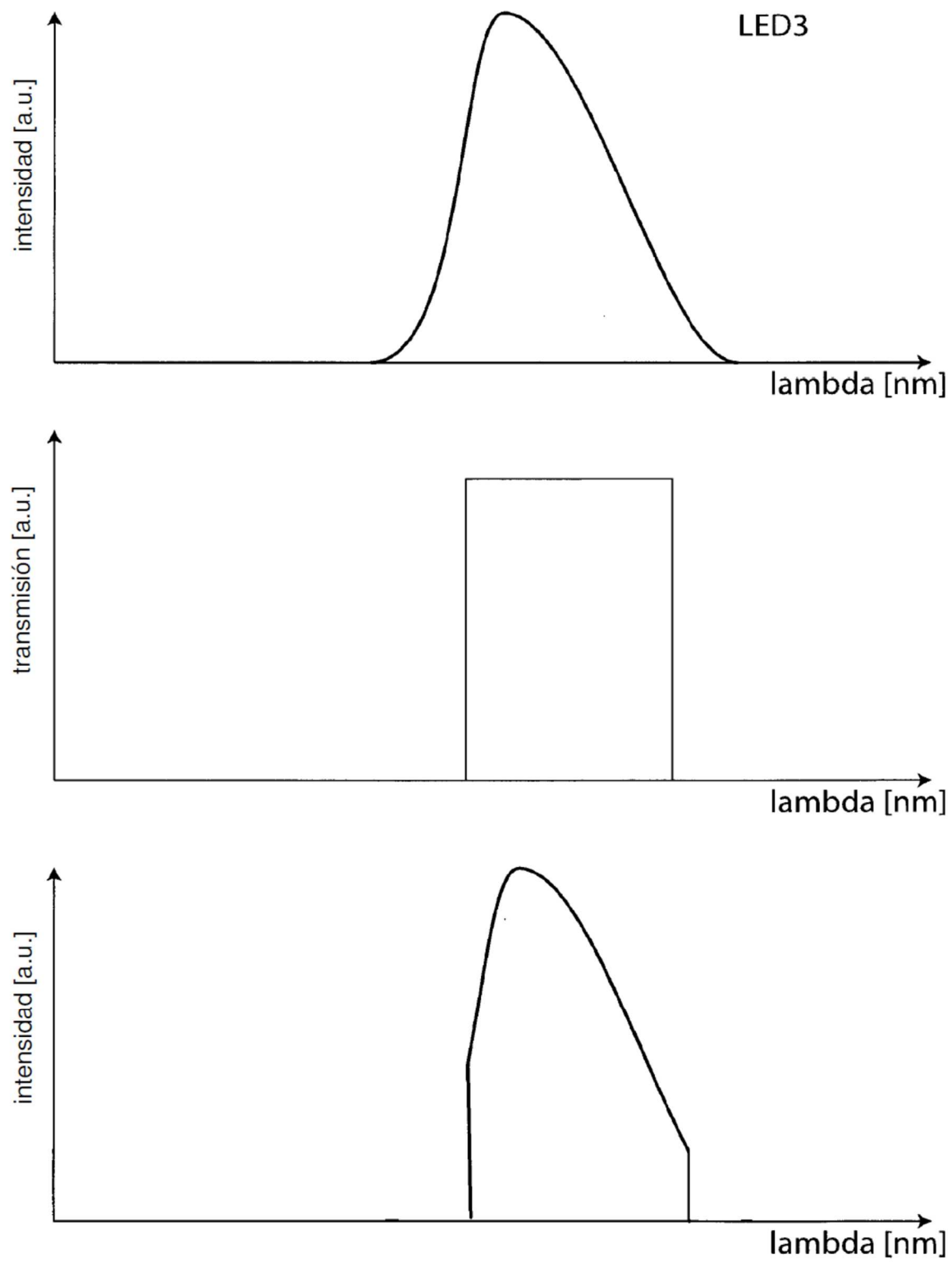


Fig. 17

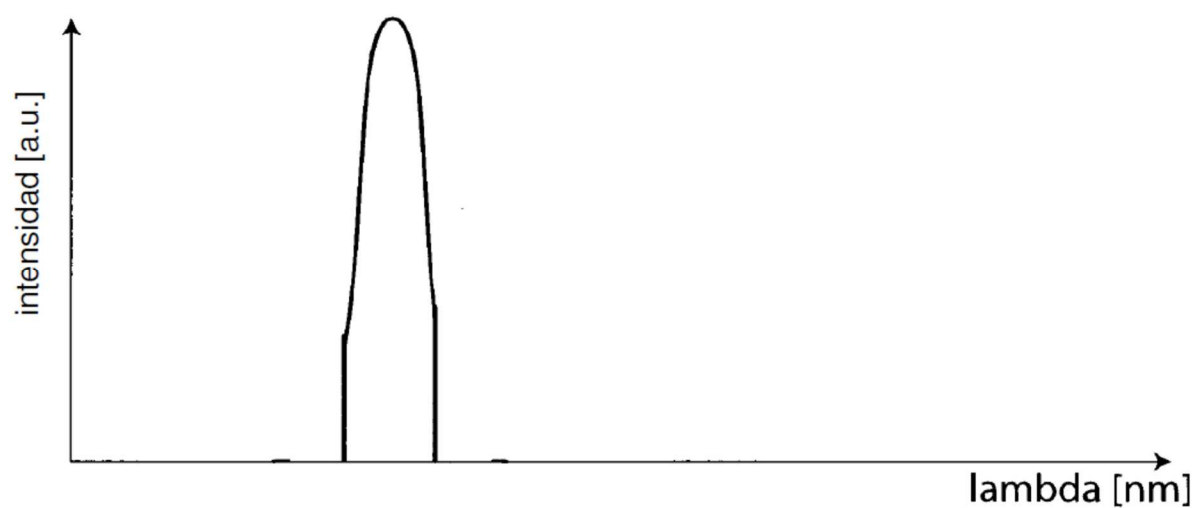
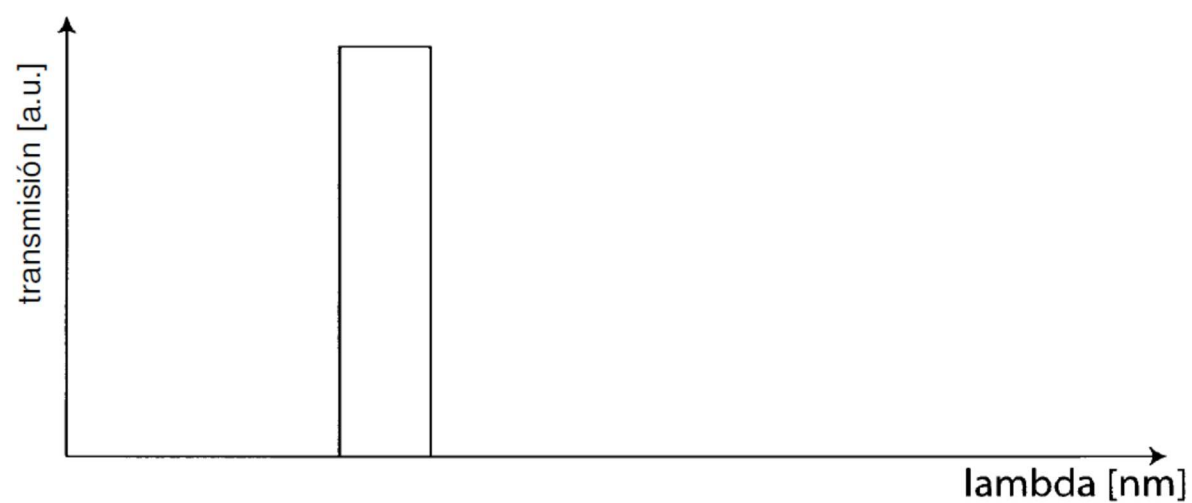
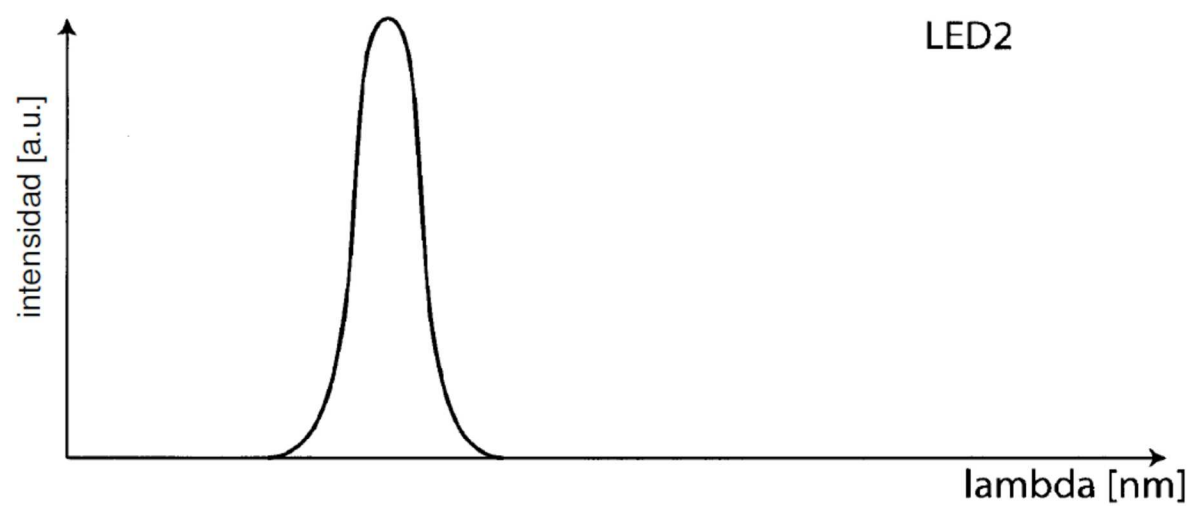


Fig. 18

LED 1

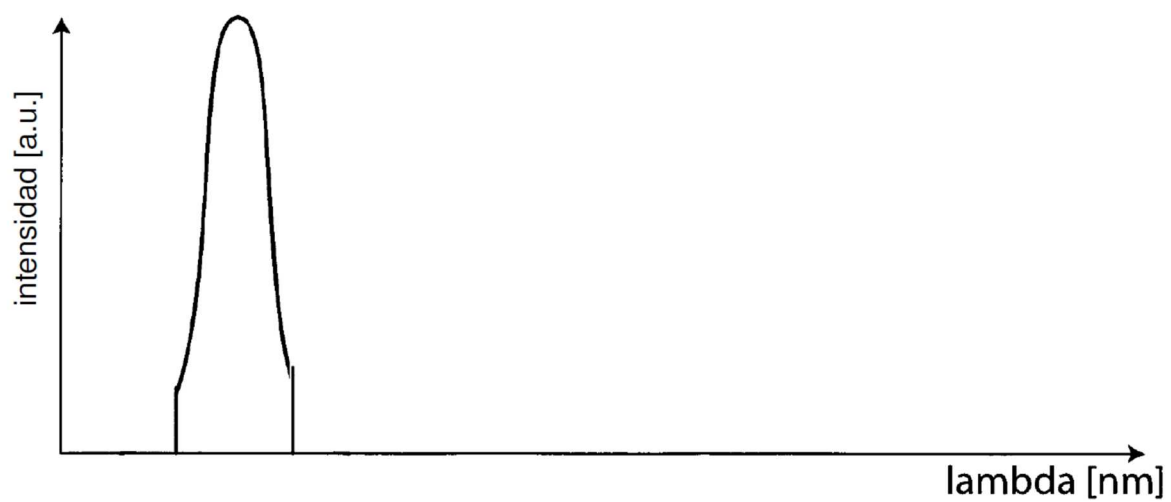
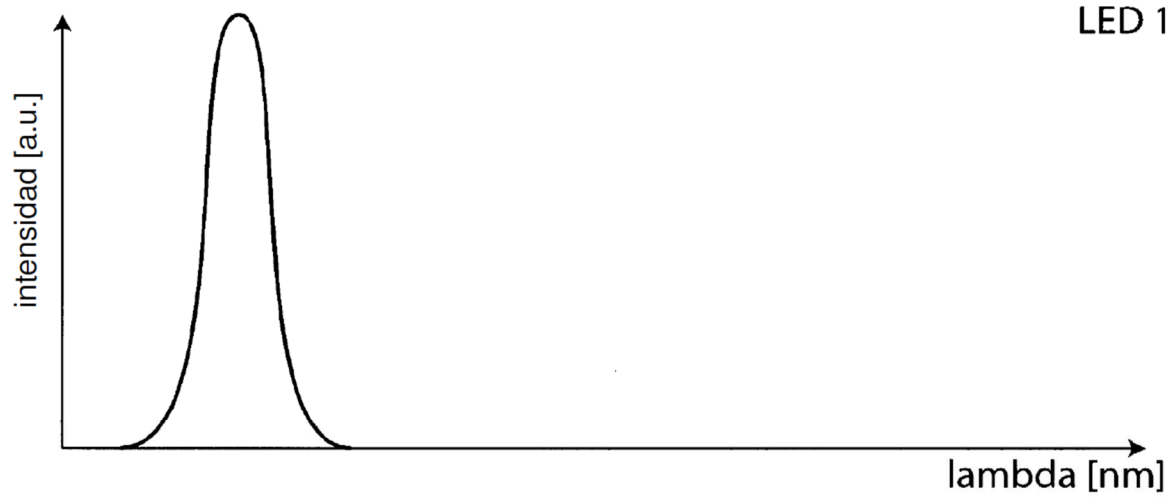
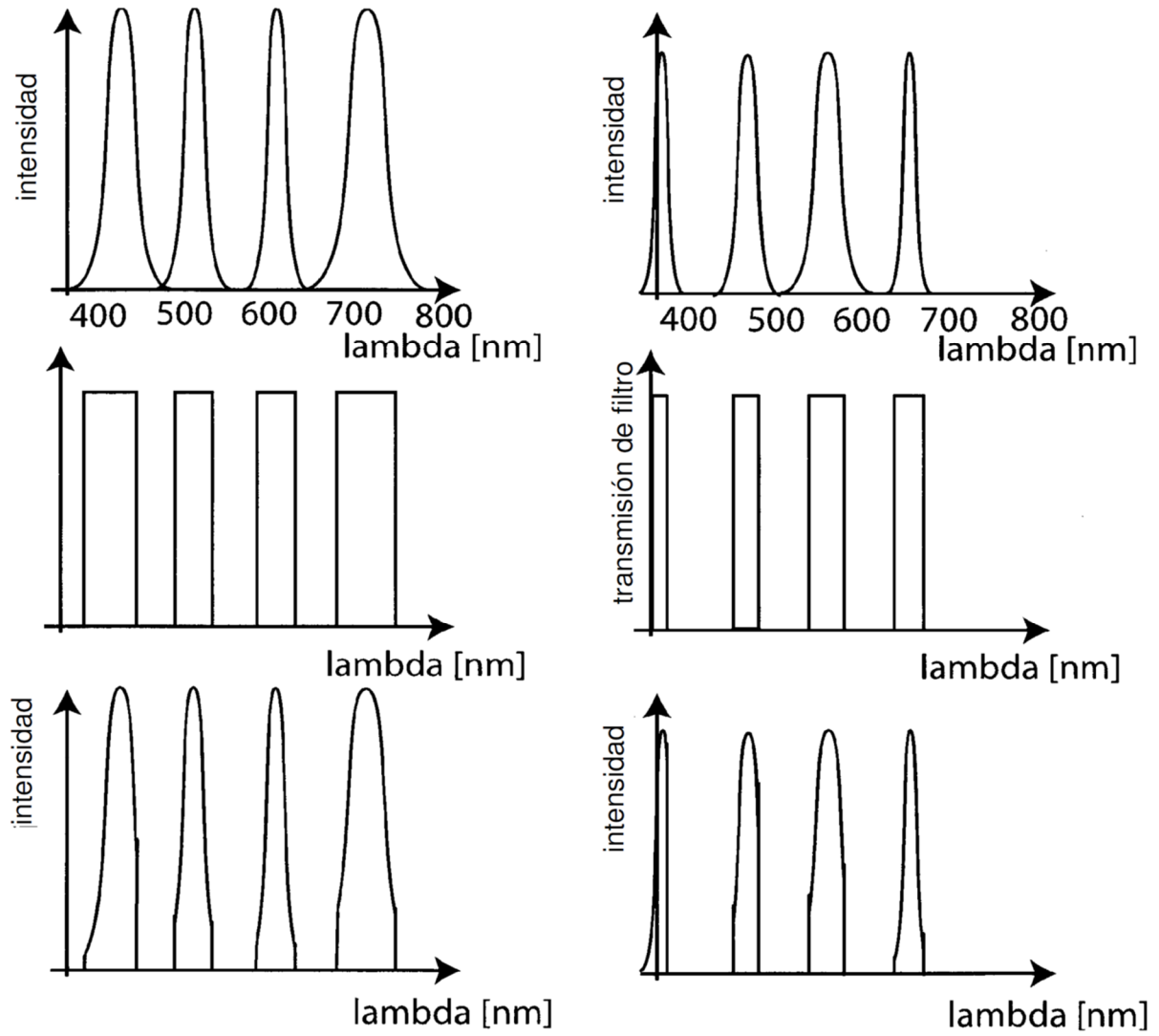


Fig. 19



Espectros de los ledes individuales de la primera luz

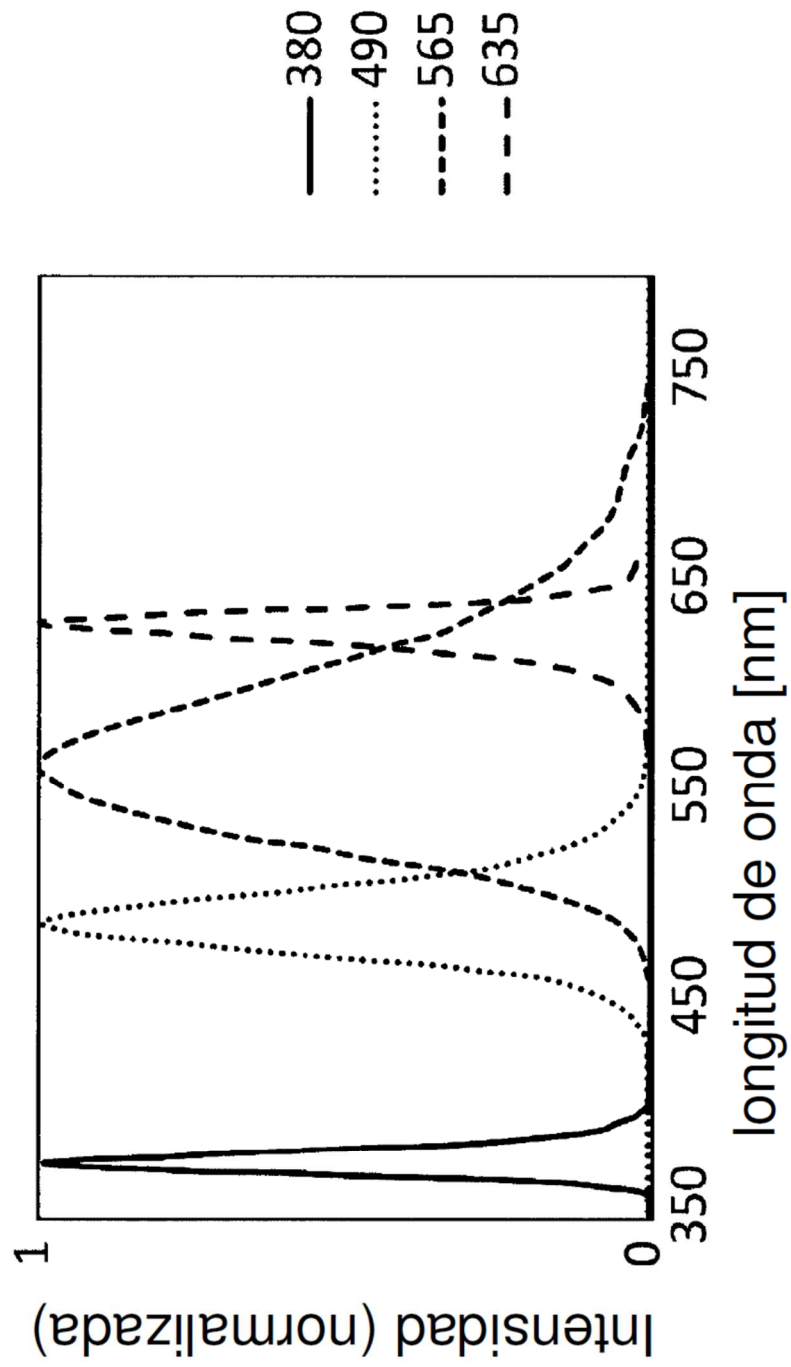


Fig. 20

Fig. 21

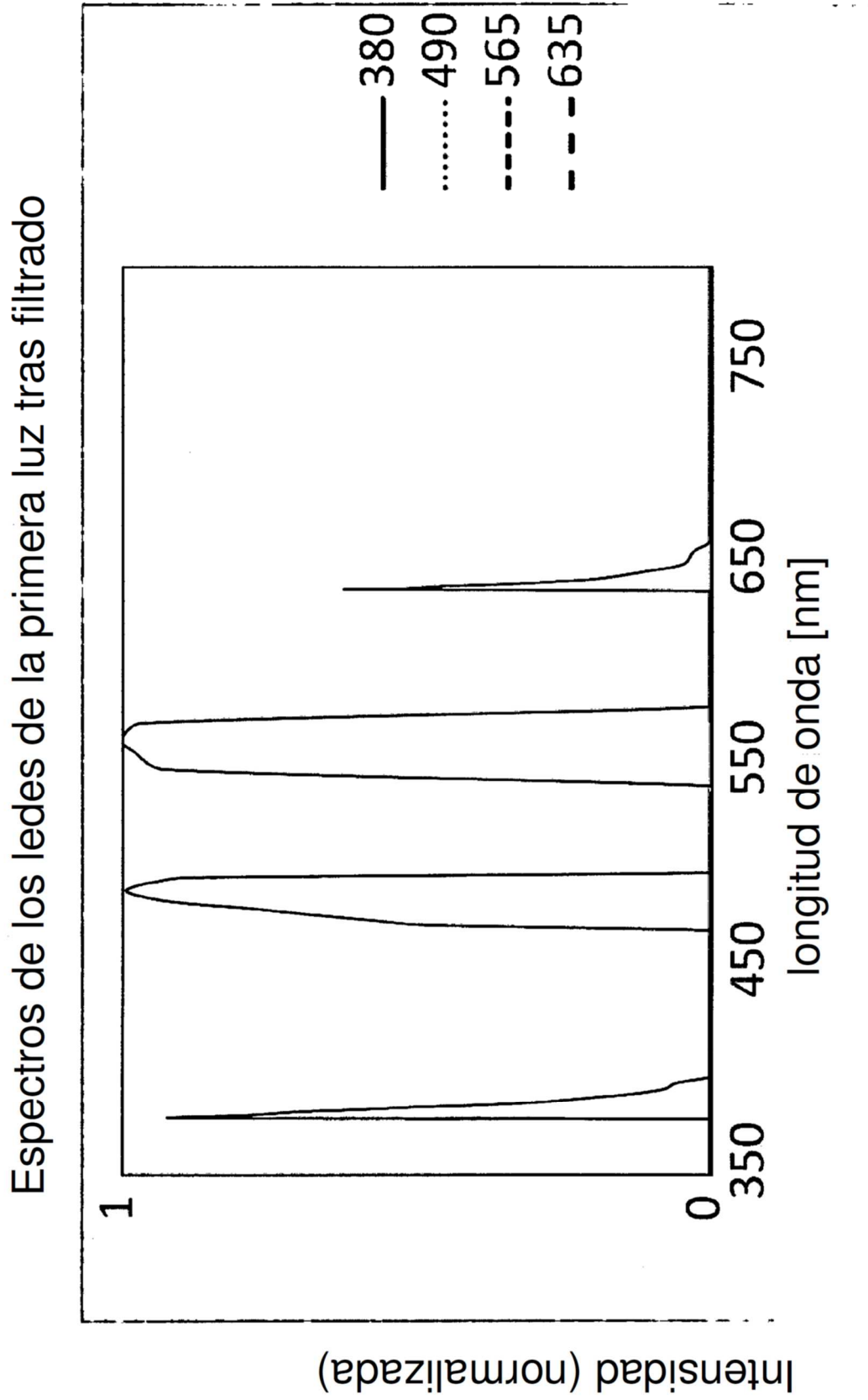


Fig. 22

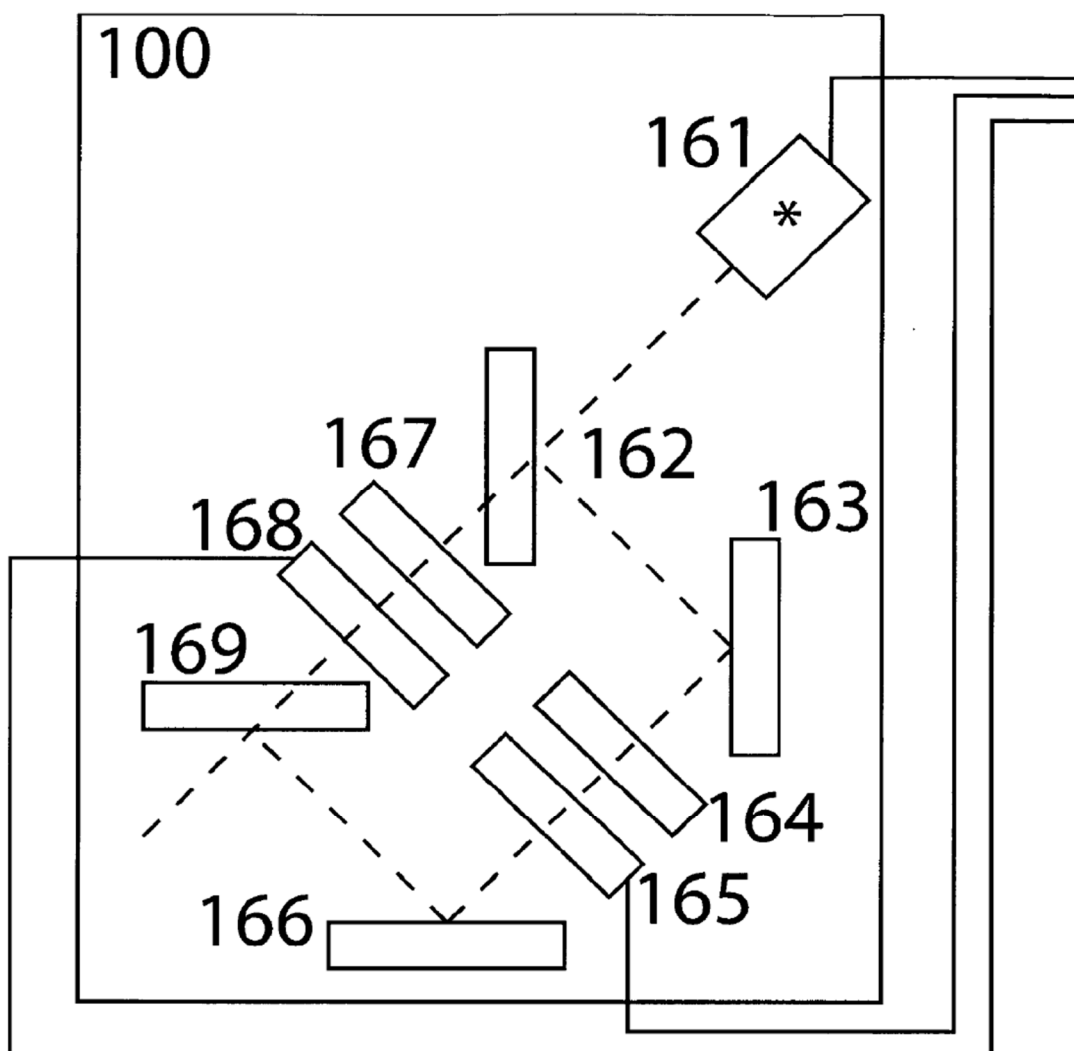


Fig. 23

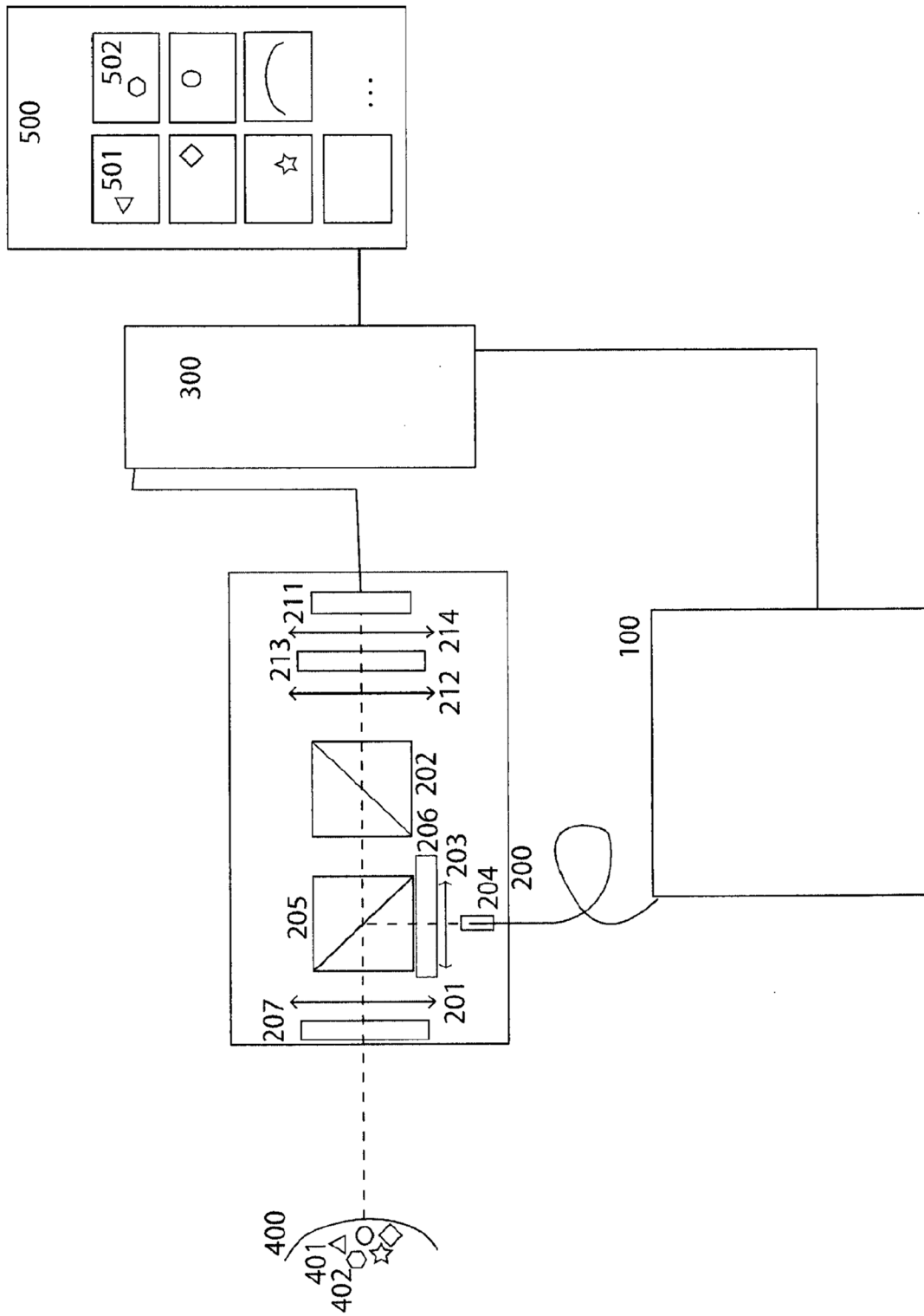


Fig. 24

R	G	R	G	R	G
G	B	R	G	R	B
R	G	G	B	R	B
G	B	R	G	G	B
R	G	G	B	R	B
G	B	R	G	G	B

Bayer
RGGB

R	G	R	G	R	G
IR	B	IR	B	IR	B
R	G	R	G	R	G
IR	B	IR	B	IR	B
R	G	R	G	R	G
IR	B	IR	B	IR	B

RGIRB

C	Y	C	Y	C	Y
G	M	G	M	G	M
C	Y	C	Y	C	Y
M	G	M	G	M	G
R	G	R	G	R	G
C	Y	C	Y	C	Y

CMYG

A	B	C	A	B	C
D	E	F	D	E	F
G	H	I	G	H	I
A	B	C	A	B	C
D	E	F	D	E	F
G	H	I	G	H	I

ABCDEFGHI

Fig. 25

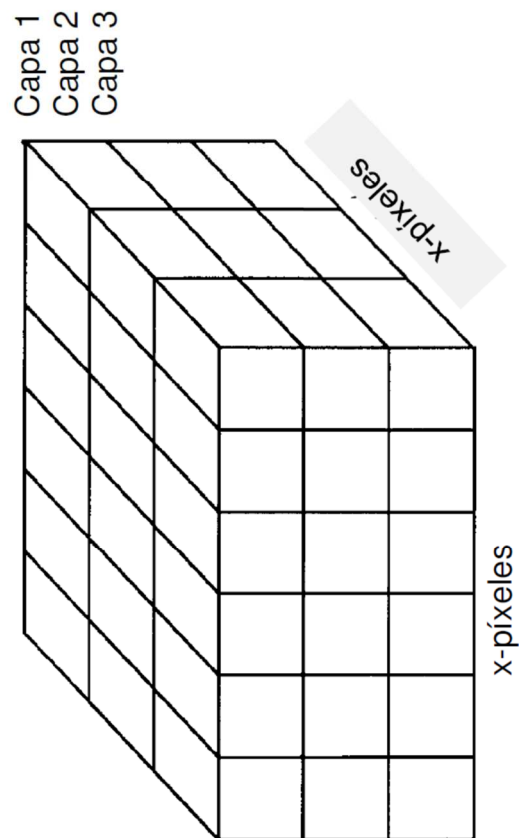
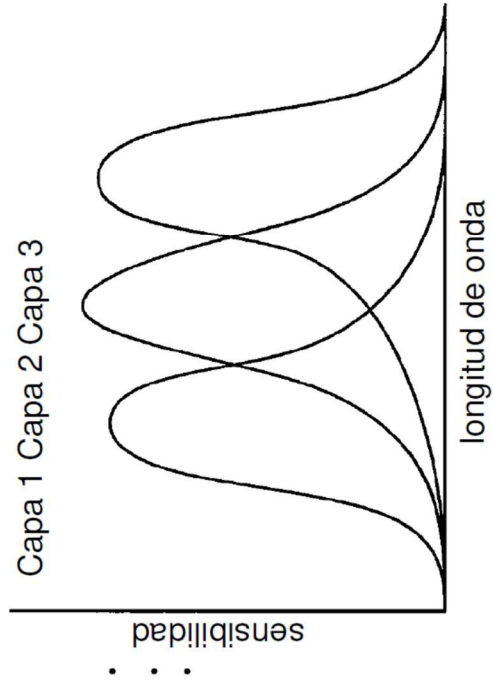


Fig. 26

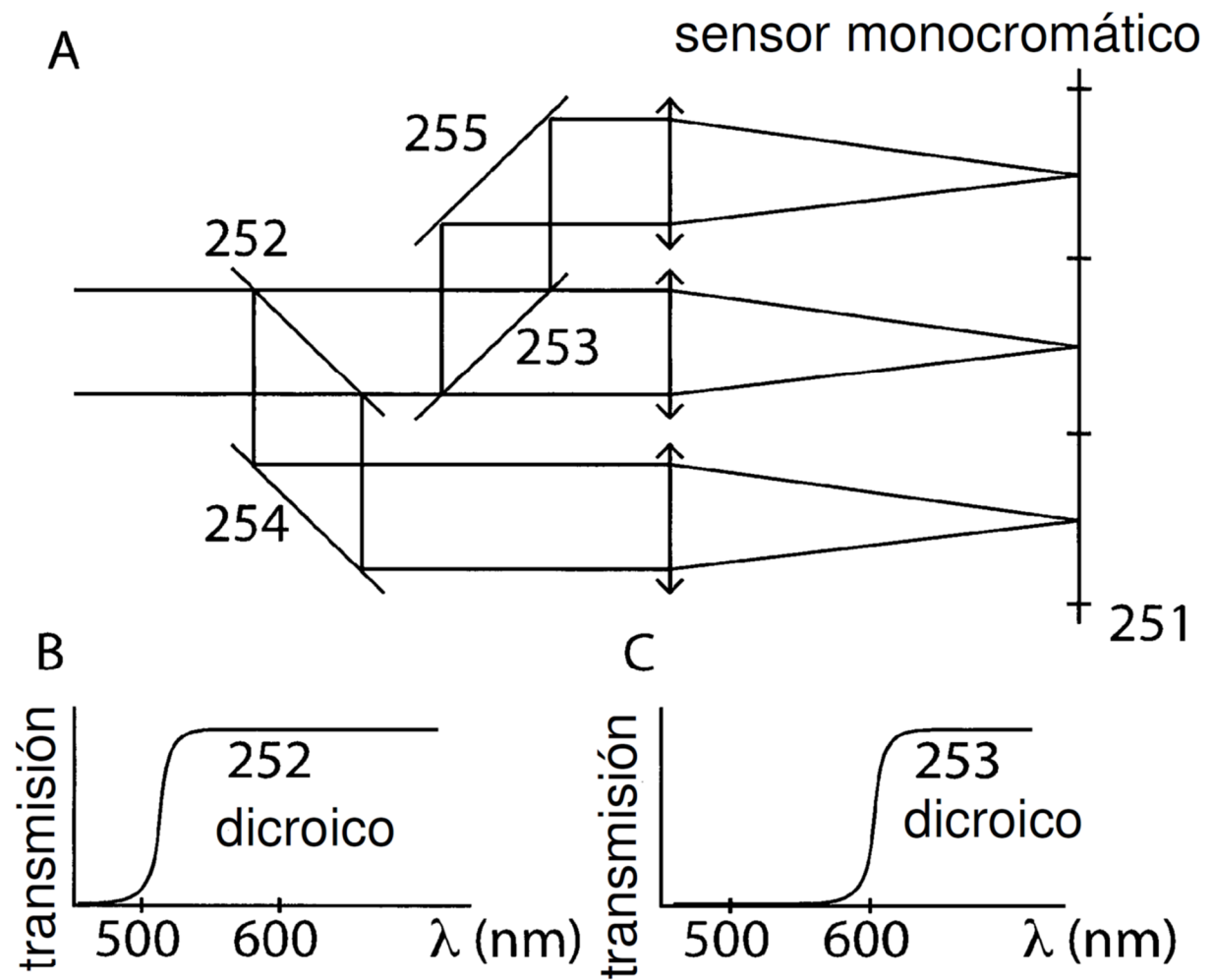


Fig. 27

multiplexación en tiempo y espectral

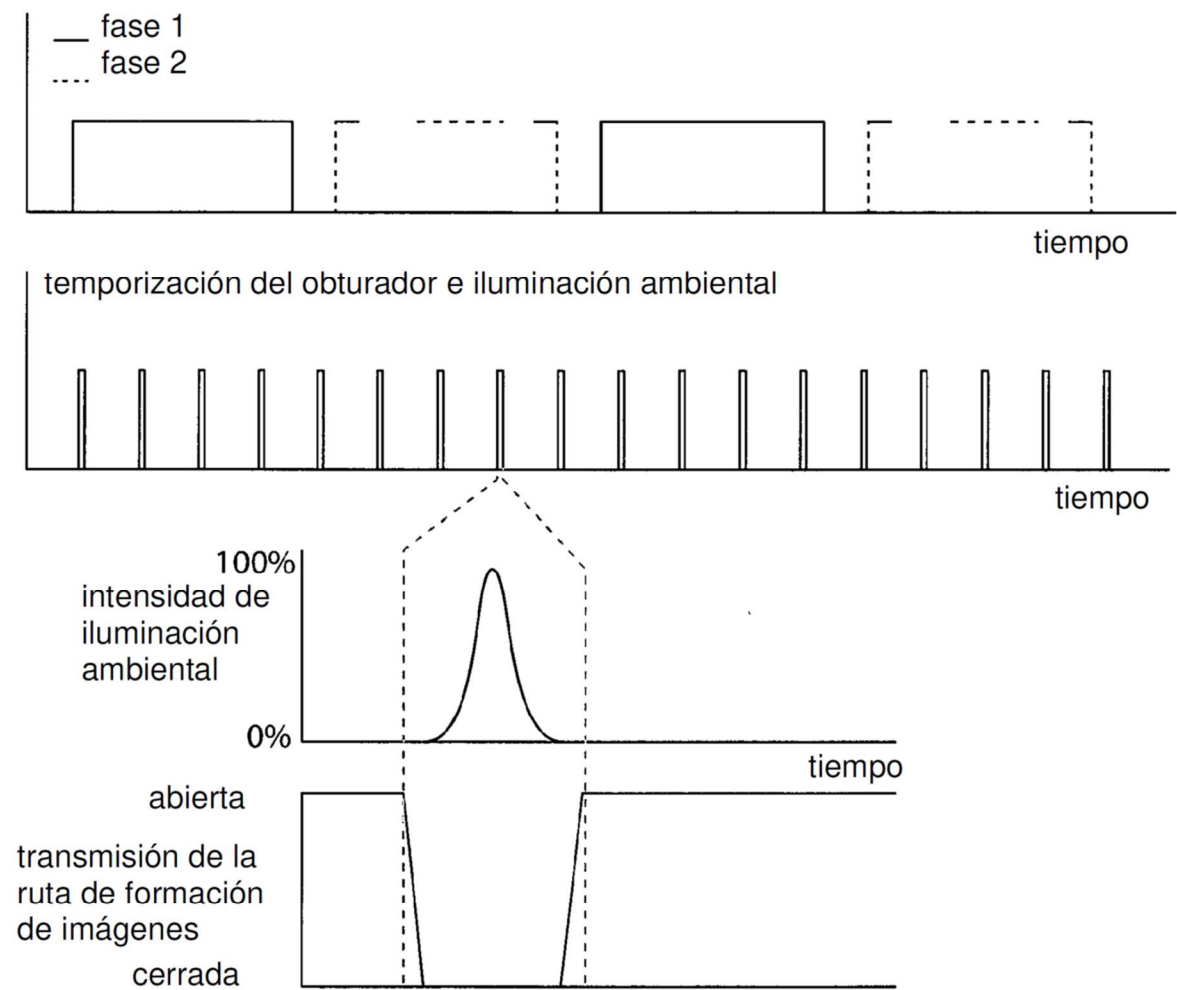


Fig. 28

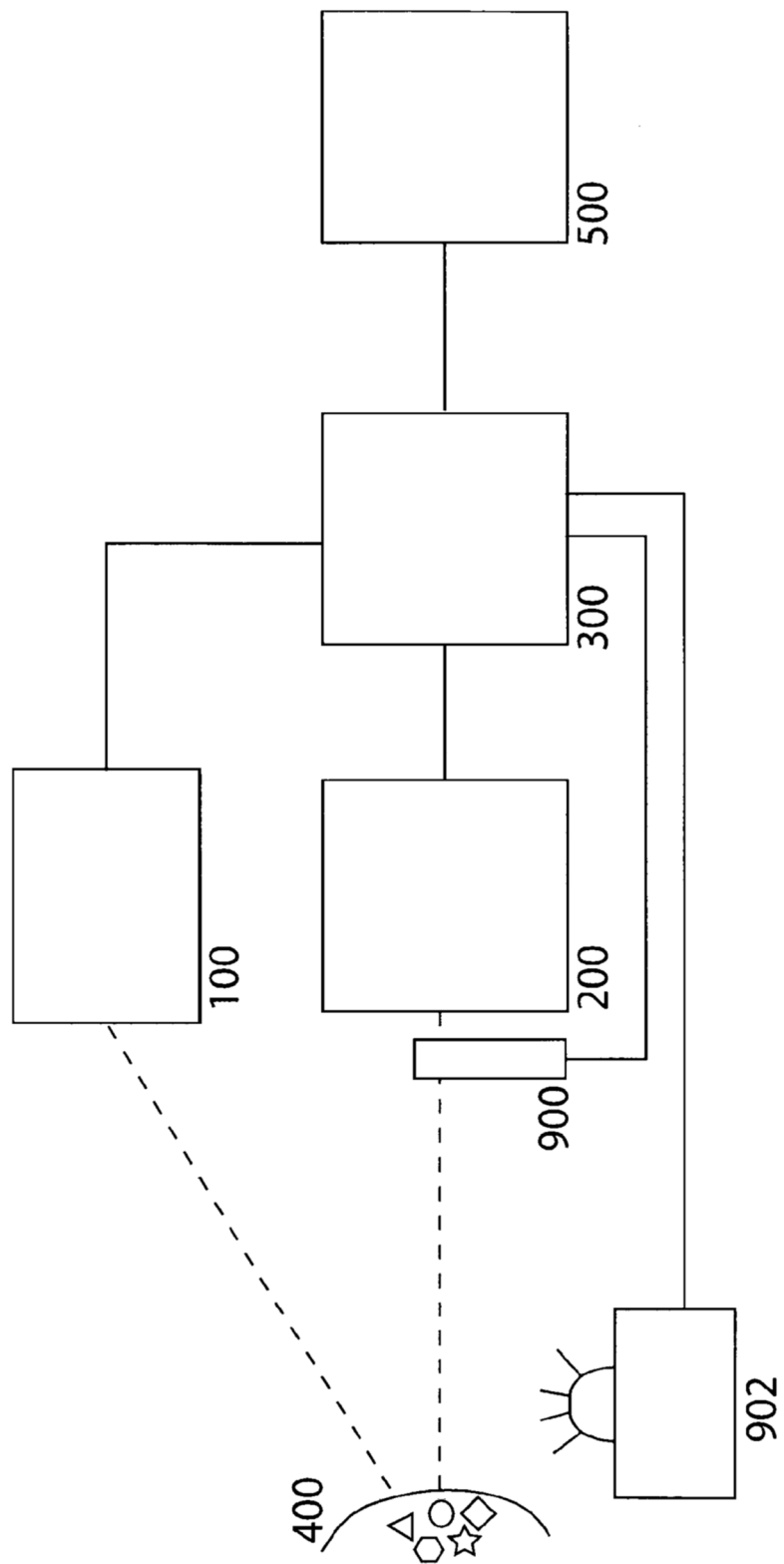


Fig. 29

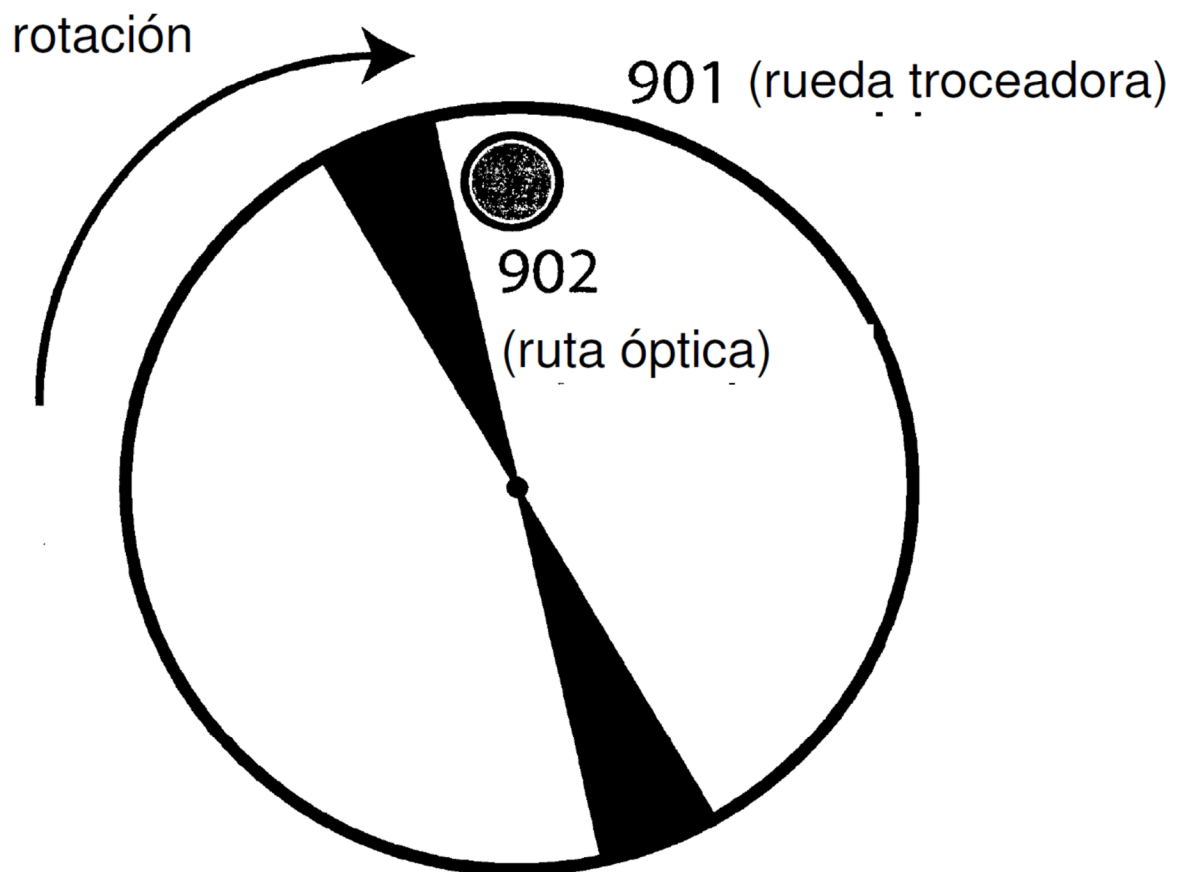


Fig. 30

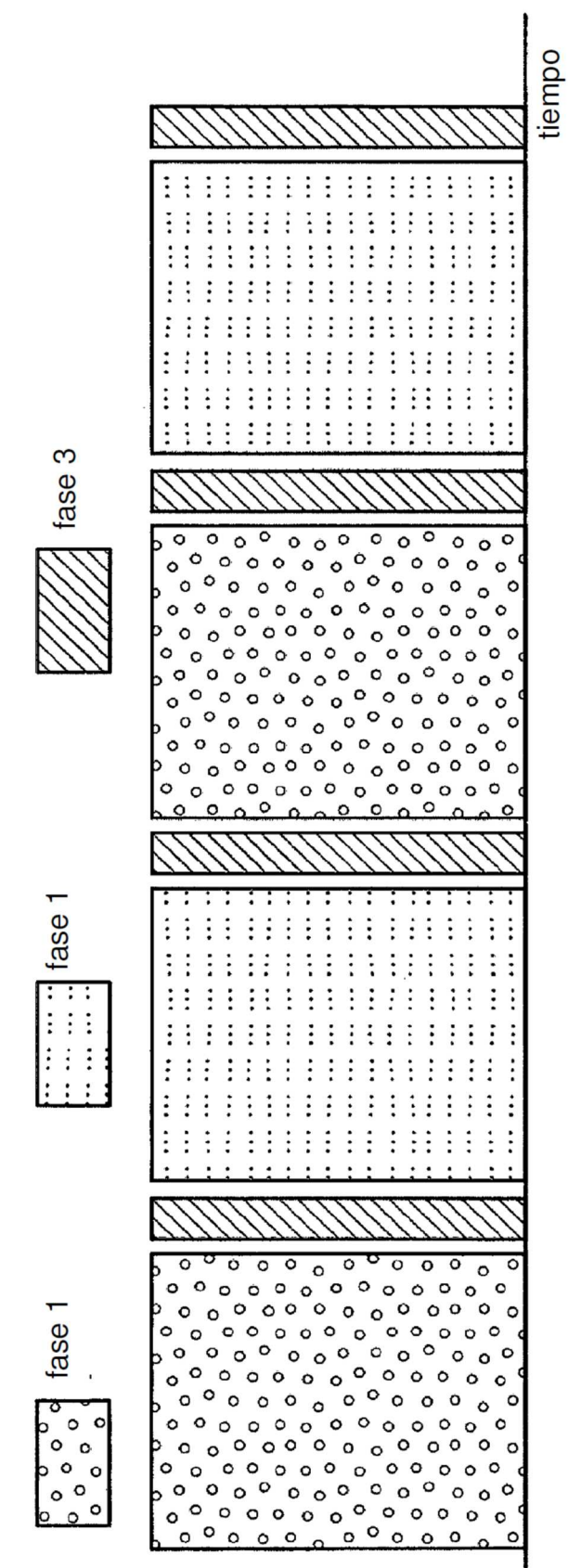
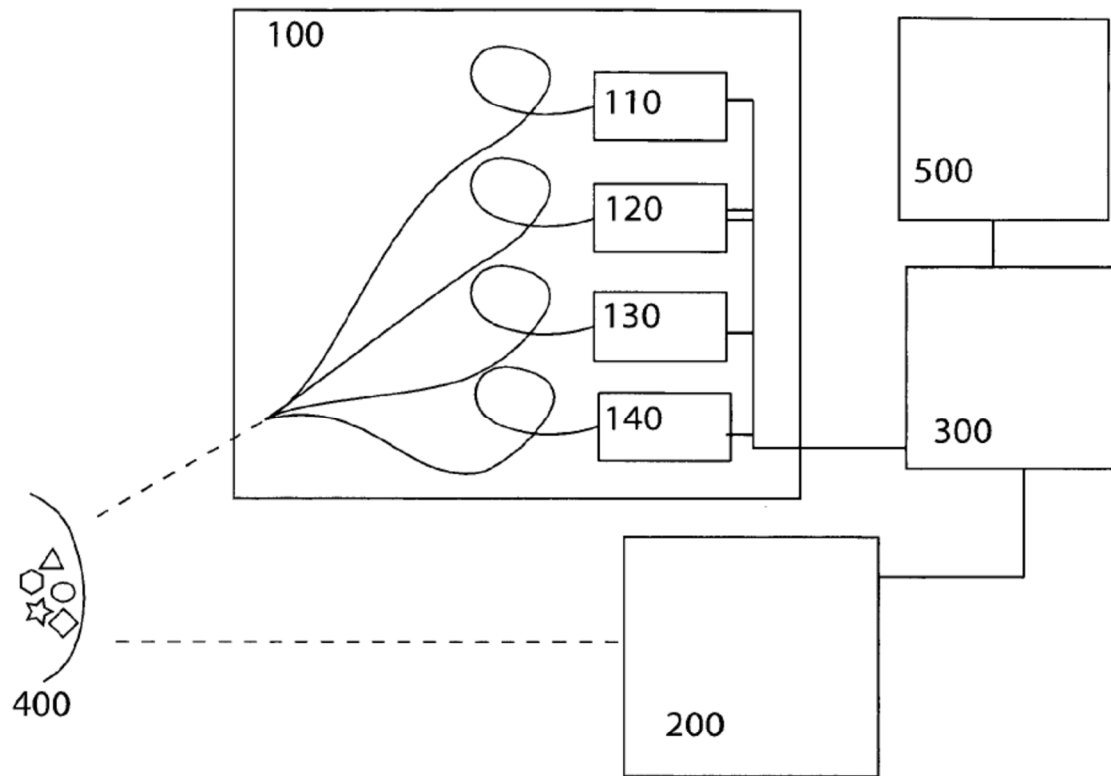


Fig. 31



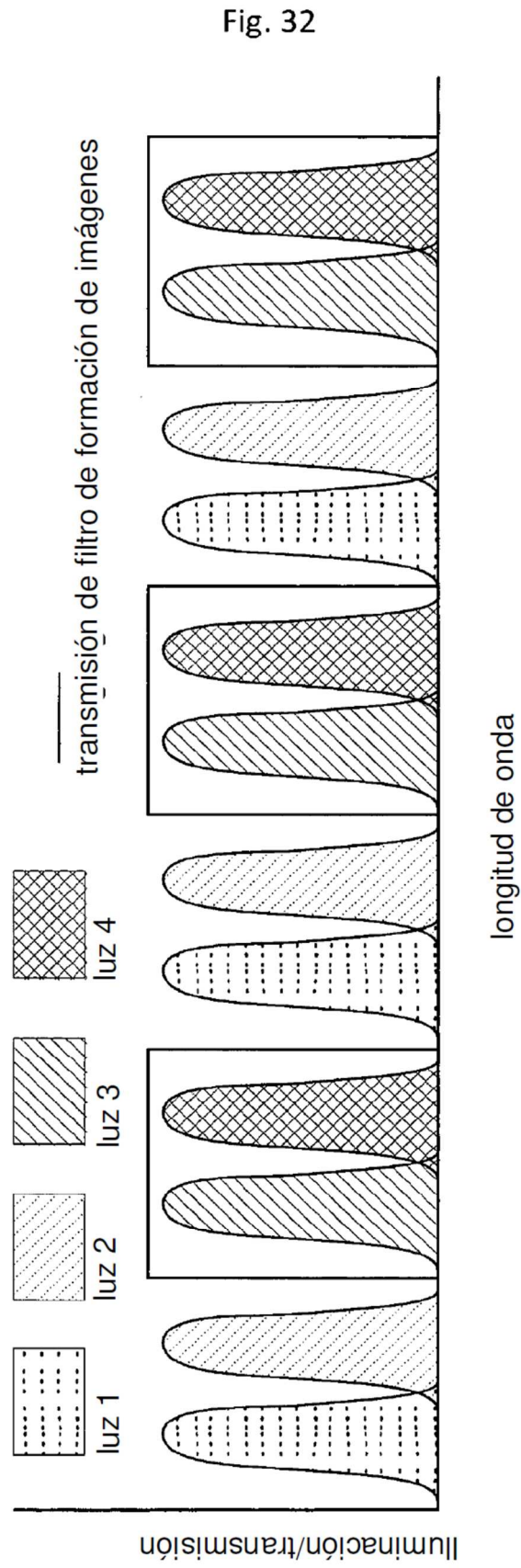


Fig. 33

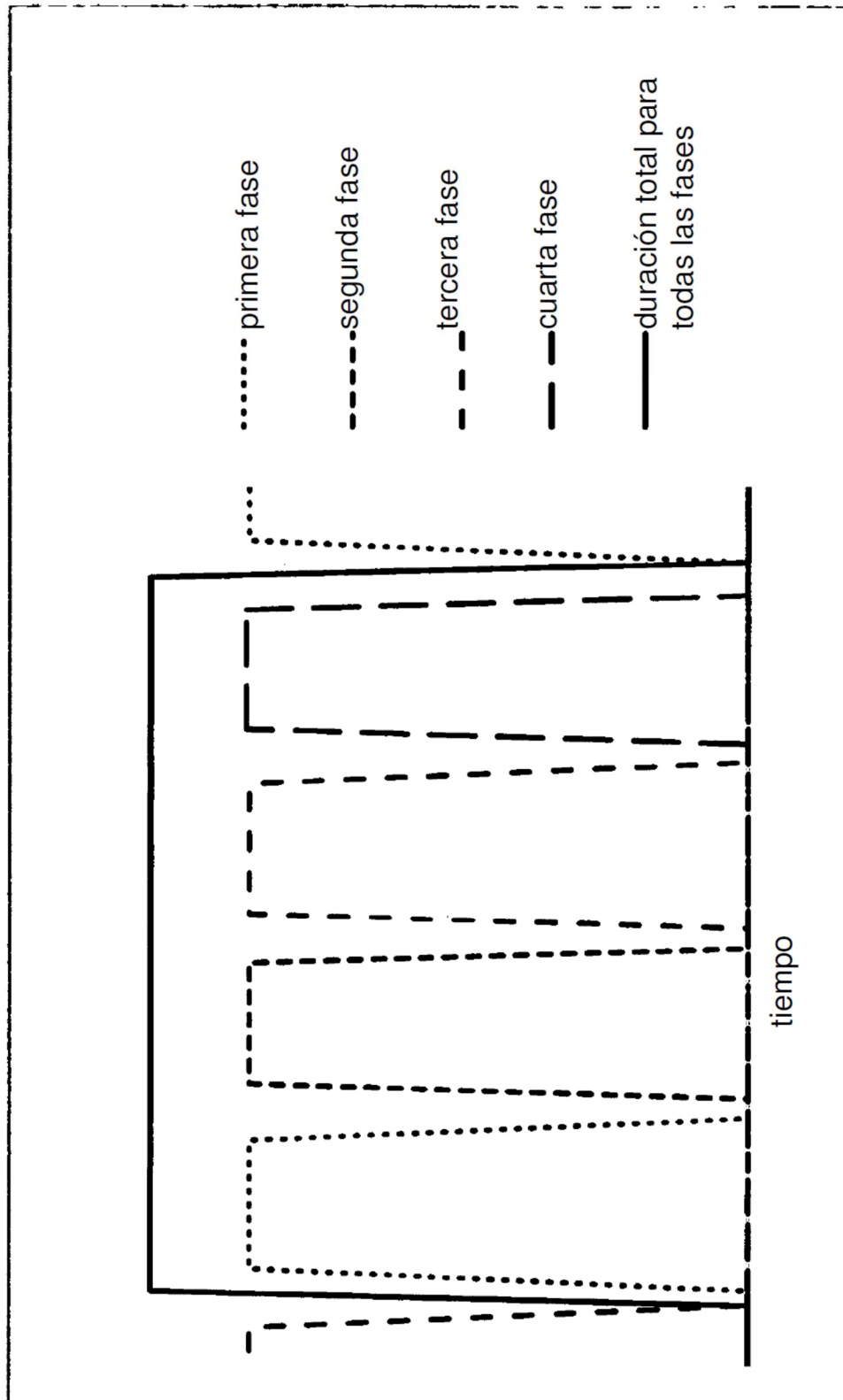


Fig. 34

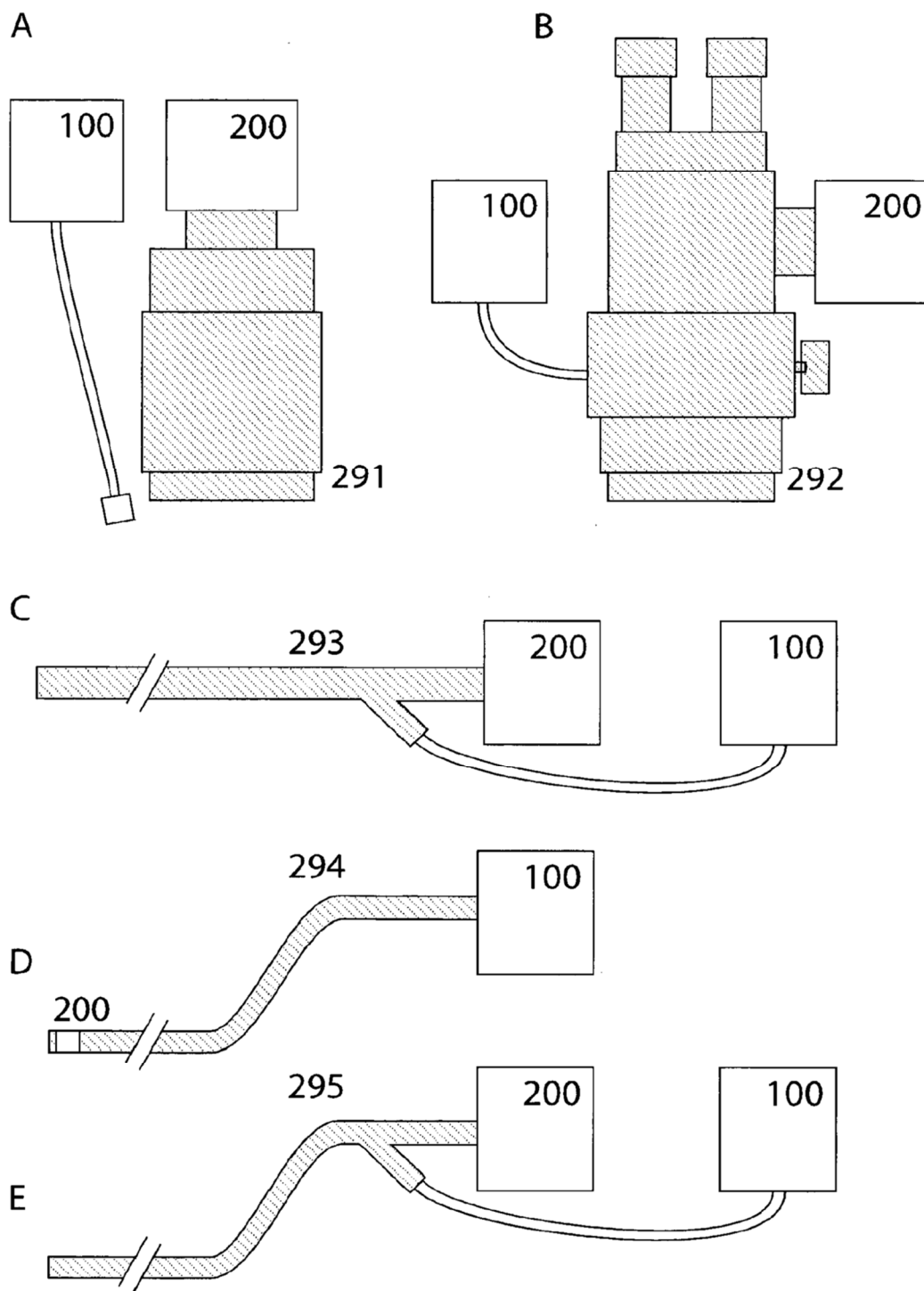


Fig. 35

