



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901476565
Data Deposito	15/12/2006
Data Pubblicazione	15/06/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	03	C		

Titolo

DUPLICATORE OTTICO D'IMMAGINE

## DESCRIZIONE

A presente invenzione è relativa ad un duplicatore ottico d'immagine, ovvero è atto alla realizzazione di immagini multiple di uno stesso oggetto corrispondenti a diverse componenti spettrali dell'oggetto stesso.

5 Nel settore tecnico di riferimento della spettroscopia ad immagini, è nota l'esigenza di ottenere da uno stesso oggetto diverse immagini, distinte l'una dall'altra sulla base della lunghezza d'onda e/o della polarizzazione. Le immagini multiple devono preferibilmente essere ottenute simultaneamente ed essere focalizzate su un medesimo rivelatore.

10 La duplicazione di immagini è particolarmente importante nelle tecniche spettroscopiche di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) in cui si studiano le interazioni di due proteine in vivo tramite l'utilizzo di due molecole fluorescenti diverse, di acquisizione di immagini ad alta risoluzione di preparazioni a doppio colorante, etc.

15 Diverse tecniche sono impiegate per ottenere due immagini spaziali di porzioni dello spettro emanato da un oggetto. Tipici sistemi si basano su elementi dispersivi che, posizionati lungo il cammino ottico, suddividono le componenti a diversa lunghezza d'onda. Un tipico elemento dispersivo è un prisma o un reticolo, in cui la dispersione avviene tramite rifrazione o  
20 diffrazione della luce, rispettivamente.

Nei brevetti statunitensi US 5926283 e US 5982497 a nome della Optical Insights, è descritto un duplicatore ottico includente un filtro dicroico per dividere il fascio di luce entrante in due fasci indipendenti aventi lunghezze d'onda superiori, e rispettivamente inferiori, alla frequenza di taglio del filtro  
25 dicroico. Il dispositivo descritto comprende inoltre due lenti aggiustabili per

indirizzare i due fasci per due percorsi ottici distinti per formare due immagini spaziali identiche, ma spettralmente distinte, dell'oggetto sul rivelatore.

Uno scopo principale della presente invenzione è quello di realizzare un  
5 duplicatore ottico d'immagine che sia di più semplice costruzione, abbia una maggiore facilità di messa a punto e conseguentemente permetta di ottenere una maggiore efficacia dello strumento stesso. Allo stesso tempo, oggetto dell'invenzione è un duplicatore i cui risultati, in termini di qualità e risoluzione dell'immagine, ottenibili siano come minimo analoghi se non  
10 migliori rispetto ai dispositivi di tecnica nota.

Il problema alla base della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un duplicatore di immagini strutturalmente e funzionalmente concepito per superare i limiti sopra esposti con riferimento alla tecnica nota citata.

15 Questo problema è risolto dal presente trovato mediante un duplicatore di immagini, avente le caratteristiche enunciate nelle rivendicazioni che seguono.

Le caratteristiche e i vantaggi dell'invenzione meglio risulteranno dalla descrizione dettagliata di un suo preferito esempio di realizzazione  
20 illustrato, a titolo indicativo e non limitativo, con riferimento agli uniti disegni in cui:

- la figura 1 è una vista prospettica schematica di un duplicatore di immagini in accordo con la presente invenzione,
- la figura 2 è una vista in esploso del duplicatore di immagini della  
25 figura 1,

- la figura 3 è una vista schematica del percorso ottico di due raggi luminosi marginali all'interno del duplicatore di figura 1,
- la figura 4 rappresenta due immagini dello stesso tipo di cellule ottenute l'una tramite il duplicatore della presente invenzione e l'altra con un duplicatore in accordo con la tecnica nota.

5 Con iniziale riferimento alle figure da 1 a 3, con 1 è generalmente indicato un duplicatore ottico di immagini realizzato in accordo con la presente invenzione.

Il duplicatore ottico 1 comprende un'apertura 2 per l'ingresso di un segnale luminoso, corrispondente preferibilmente ad un'immagine, proveniente ad  
10 esempio in uscita da un microscopio connesso al duplicatore 1 stesso. Il segnale di immagine entrante, rappresentato con la freccia F in figura 3, è relativo ad un oggetto spaziale (non raffigurato) campione esaminato tramite il microscopio. Preferibilmente, in prossimità dell'apertura 2, il  
15 duplicatore 1 comprende primi mezzi di connessione 3 per l'attacco del microscopio.

Il microscopio in oggetto utilizzato in combinazione con il duplicatore 1 può essere di qualunque tipo, e comprende generalmente una lente obiettivo (non rappresentata) per ricevere luce dall'oggetto esaminato così da creare  
20 un'immagine che, come anzidetto, viene quindi inviata all'apertura 2 del duplicatore 1. Preferibilmente in esperimenti di spettroscopia FRET, la luce utilizzata per l'illuminazione dell'oggetto esaminato è una luce monocromatica ad esempio emessa da un monocromatore Policrome V® realizzato dalla TILL PHOTONICS GmbH.

25 L'apertura 2 è preferibilmente disposta perpendicolarmente all'asse ottico

del duplicatore ed ha una conformazione a fenditura preferibilmente rettangolare, tuttavia la sua conformazione non è essenziale per l'applicazione degli insegnamenti della presente invenzione. L'apertura 2 ha preferibilmente la funzione di field stop, e serve per limitare il campo di vista dell'oggetto dell'immagine.

Il posizionamento dell'apertura 2 coincide con un primo piano immagine P1 (si veda la figura 3) in cui è formata l'immagine in uscita dal microscopio dell'oggetto di interesse, questo per delineare in modo netto i contorni della regione di interesse in questo piano.

Il duplicatore 1 comprende inoltre un'uscita 6, in prossimità della quale sono posizionati inoltre preferibilmente secondi mezzi di connessione 7 per la connessione del duplicatore 1 ad un sensore 15 (visibile in fig. 3). Il segnale in uscita dal duplicatore 1 comprende due immagini distinte (semi-immagini) dello stesso oggetto derivanti dall'immagine in ingresso, ma aventi caratteristiche spettrali differenti. La larghezza dell'apertura 2 è selezionata in funzione delle dimensioni del sensore 15 su cui si proiettano le due semi-immagini e può essere variata ad esempio controllandola manualmente od elettronicamente.

Il sensore 15 connesso al duplicatore 1 è atto alla memorizzazione ed all'analisi delle due immagini derivate. Ad esempio, un sensore 15 utilizzato nella presente invenzione può essere un sensore CCD o MOS.

A valle dell'apertura 2, relativamente alla direzione del segnale luminoso F, è posizionata una lente 4, ad esempio in un porta-lenti cilindrico 4a, per collimare ogni raggio luminoso del segnale proveniente dall'apertura 2, così da renderli paralleli. I raggi collimati emergenti sono quindi diretti verso

mezzi di dispersione 5 atti a separare il segnale incidente in più componenti, come delineato nel seguito. In particolare, l'immagine incidente F viene separata in sue differenti componenti spettrali.

I mezzi di dispersione 5 comprendono un filtro dicroico 10 che trasmette una porzione della luce incidente su esso. In dettaglio, un filtro dicroico è tale per cui esso suddivide il segnale luminoso incidente in due fasci tra loro separati: un primo fascio contiene tutte le lunghezze d'onda presenti nel fascio incidente che sono al di sopra della lunghezza d'onda di taglio del filtro dicroico, mentre il secondo fascio contiene tutte le lunghezze d'onda al di sotto di tale lunghezza di taglio. L'immagine originale è quindi suddivisa in due distinte immagini, contenenti distinte componenti spettrali, che si propagano lungo due distinti cammini ottici. Generalmente, il fascio con lunghezze d'onda maggiori della lunghezza di taglio è il fascio trasmesso, mentre il fascio con lunghezze d'onda inferiori a quella di taglio è il fascio riflesso (rappresentati dai fasci T e R della figura 3).

Nella tecnica nota, in un microscopio a fluorescenza, un filtro dicroico è utilizzato generalmente per separare la luce di emissione fluorescente dalla luce di eccitazione. Un filtro dicroico trasmette all'incirca il 90% della luce incidente avente una lunghezza d'onda al di sopra del valore di soglia e riflette all'incirca il 90% della luce incidente avente una lunghezza d'onda al di sotto del valore di soglia.

Alternativamente, è previsto posizionare un prisma o un reticolo al posto del filtro dicroico 10 per ottenere la separazione in due fasci aventi caratteristiche spettrali distinte.

Il filtro dicroico 10 è preferibilmente posizionato ad un angolo di 45°

rispetto all'asse ottico del duplicatore 1, ed in particolare ad un angolo di 45° rispetto alla direzione di propagazione del fascio incidente sul dicroico 10, collimato dalla lente di collimazione 4.

I mezzi di dispersione 5 includono inoltre mezzi di re-indirizzamento del fascio trasmesso, in particolare uno specchio riflettente 11. Nella definizione di specchio riflettente qui data è incluso anche un distinto elemento ottico tipo un prisma.

Il fascio trasmesso T dal dicroico 10 si propaga in una direzione sostanzialmente invariata rispetto alla direzione di propagazione del fascio collimato mentre il fascio riflesso R, che si propaga inizialmente perpendicolarmente al fascio collimato, è re-indirizzato dallo specchio riflettente 11 di ulteriori 90° così da risultare parallelo al fascio trasmesso T.

Il posizionamento dello specchio riflettente 11 è regolabile, ovvero esso è montato su opportuni mezzi di regolazione 11a per angolare opportunamente lo specchio 11 rispetto all'asse ottico del duplicatore 1 così da regolare e definire correttamente una delle due immagini in uscita dal duplicatore in modo tale che si formi sul sensore 15.

Sia il fascio trasmesso T che il fascio riflesso R dopo il suo re-indirizzamento grazie allo specchio riflettente 11 sono quindi opzionalmente incidenti due distinti filtri ottici 13 e 14, disposti in un elemento porta-filtri 13a.

Ciascun filtro ottico 13, 14 è preferibilmente un filtro di interferenza, più precisamente un filtro di emissione, così da meglio definire il contenuto, in termini di lunghezze d'onda presenti, dei fasci riflesso R e trasmesso T . Questi filtri sono pertanto utilizzati nel caso in cui si voglia una maggiore definizione delle lunghezze d'onda presenti nei due fasci riflesso R e

trasmesso T (ad esempio due definiti intervalli di lunghezze d'onda) rispetto alla semplice suddivisione "maggiore, minore di una certa soglia" effettuata dal dicroico 10. Ogni filtro 13,14 è pertanto selezionato in modo tale da lasciar passare unicamente un intervallo di lunghezze d'onda d'interesse.

5 I due fasci riflesso R e trasmesso T, eventualmente filtrati, incidono sui mezzi di formazione dell'immagine 12, atti a formare due immagini spazialmente identiche, ma spettralmente differenti, che costituiscono il segnale di uscita del duplicatore 1. In figura 3 è visibile il porta lente 12a dei mezzi di regolazione 12. Entrambe le immagini sono formate nel  
10 medesimo secondo piano immagine P2, che è preferibilmente coincidente con il piano definito dal sensore di rilevazione 15, per l'acquisizione delle stesse.

I mezzi di formazione dell'immagine 12 possono essere costituiti da un unico elemento ottico o da più elementi tra loro spazialmente separati,  
15 come una pluralità di lenti ad esempio un doppietto acromatico.

Le immagini che si formano sul sensore 15 sono costitutivamente complanari e vengono allineate agendo sulla specchio 11 tramite i mezzi di regolazione 11a.

Il segnale di uscita del duplicatore 2 pertanto comprende due immagini, che  
20 si formano entrambe nel medesimo piano P2, disposte in modo tale che ogni immagine ricopra sostanzialmente metà dell'area totale utile del sensore 15. Quest'ultimo quindi registra ed elabora le immagini, tramite tecniche di analisi standard in un elaboratore elettronico.

L'immagine dell'oggetto esaminato pertanto proveniente dal microscopio  
25 entra nel duplicatore 1 di immagini ove viene suddivisa in due immagini

distinte che sono formate sul medesimo rivelatore. Le due immagini differiscono per la loro composizione spettrale.

In fig. 4 sono raffigurati i segnali in uscita di due distinti duplicatori di immagine: il duplicatore di immagine della presente invenzione (fotografie di sinistra) ed un duplicatore di immagini della tecnica nota disponibile in commercio con il nome di Dual View <sup>™</sup> della Optical Insights, LLC (fotografie di destra). Per ciascun duplicatore, le immagini mostrate rappresentano cellule dello stesso tipo in tre campi diversi.

In dettaglio, l'oggetto analizzato dal microscopio Olympus BX51 a fluorescenza con ingrandimento 80X (ingrandimento finale al sensore con campo di 125  $\mu\text{m}$  e sensore di 10 mm) connesso al duplicatore è dato da cellule CHO (Chinese Hamster Ovarian Cells) rese fluorescenti da proteine CFP (Cyan Fluorescent Protein) e YFP (Yellow Fluorescent Protein). eccitate a  $\lambda=430\pm 5$  nm. Le due proteine citate sono fluorofori che offrono una ragionevole separazione spettrale ed una luminosità compatibili con misure di FRET, senza richiedere eccitazione ultravioletta dannosa per le cellule. Il donatore CFP è eccitato utilizzando il monocromatore tramite il duplicatore 1 e il duplicatore della tecnica nota Dual View, l'emissione di CFP e di YFP sono simultaneamente registrate su una singola CCD ad alta sensibilità come da figura 4. Sono stati usati filtri HQ480/40m e HQ535/30m e dicroico 515dcxr.

Come visibile dalla figura 4, la qualità e risoluzione delle immagini ottenute con il duplicatore della presente invenzione sono di qualità superiore a quelle ottenute tramite il duplicatore Dual View, benché il duplicatore oggetto della presente domanda sia dotato di una maggiore semplicità di

realizzazione dovuta ad un minore numero di componenti costitutivi.

L'invenzione risolve pertanto il problema proposto raggiungendo numerosi vantaggi sopra descritti rispetto alla tecnica nota citata.

## RIVENDICAZIONI

1. Duplicatore di immagini (1) per duplicare un'immagine entrante relativa ad un oggetto spaziale esaminato in due immagini in un medesimo piano-immagine aventi caratteristiche spettrali distinte, comprendente:

5 - mezzi di dispersione (5) per suddividere un segnale luminoso (F) relativo a detta immagine entrante in due fasci distinti (T,R), ciascun fascio (T;R) possedendo caratteristiche ottiche distinte rispetto all'altro (T;R),

10 - mezzi di formazione dell'immagine (12), per ottenere un segnale in uscita includente due immagini distinte formate su un medesimo piano immagine (P2), dette immagini distinte aventi caratteristiche spettrali distinte ma rappresentanti detto medesimo oggetto spaziale esaminato,

15 - caratterizzato dal fatto che detti mezzi di dispersione (5) comprendono un unico specchio riflettente (11) per l'indirizzamento di uno di detti fasci distinti (T;R) verso detti mezzi di formazione dell'immagine (12).

2. Duplicatore d'immagini (1) secondo la rivendicazione 1, in cui detti dispersione (5) comprendono un filtro dicroico (10) a monte di detto specchio riflettente (11), relativamente alla direzione di detto segnale luminoso in ingresso (F), detto filtro dicroico (10) suddividendo detto segnale in ingresso in detti fasci distinti (T,R), un fascio riflesso (R) ed in un fascio trasmesso (T).

25 3. Duplicatore d'immagini (1) secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui

detto piano immagine (P2) è disposto in corrispondenza di un sensore (15) di rilevazione.

4. Duplicatore di immagini (1) secondo la rivendicazione 2 o 3, in cui detto filtro dicroico (10) è posizionato ad un angolo sostanzialmente di 45° rispetto all'asse di propagazione di detto segnale di ingresso (F).

5. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, comprendente, a monte di detto filtro dicroico (10), una lente di collimazione (4), per collimare detto segnale in ingresso.

6. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni da 2 a 5, comprendente, a valle di detto filtro dicroico (10), almeno un filtro ottico (14;13) per filtrare detto segnale riflesso (R) e/o detto fascio trasmesso (T).

7. Duplicatore di immagini (1) secondo la rivendicazione 6, comprendente due filtri ottici (13,14) per filtrare detto fascio riflesso (R) e detto fascio trasmesso (T).

8. Duplicatore di immagini (1) secondo la rivendicazione 5 o 6, in cui detto filtro ottico (14;13) è un filtro di interferenza.

9. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, comprendente un'apertura (2) per l'ingresso di detto segnale in ingresso.

10. Duplicatore di immagini (1) secondo la rivendicazione 9, in cui detta apertura è una fenditura.

11. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, comprendente primi mezzi di connessione (3) per la

connessione ad un microscopio.

12. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, includente mezzi di regolazione (11a) di detto specchio (11) così da angolare opportunamente detto specchio (11) rispetto a detto segnale in ingresso.

5

13. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, in cui detti mezzi di formazione dell'immagine (12) comprendono un doppietto acromatico.

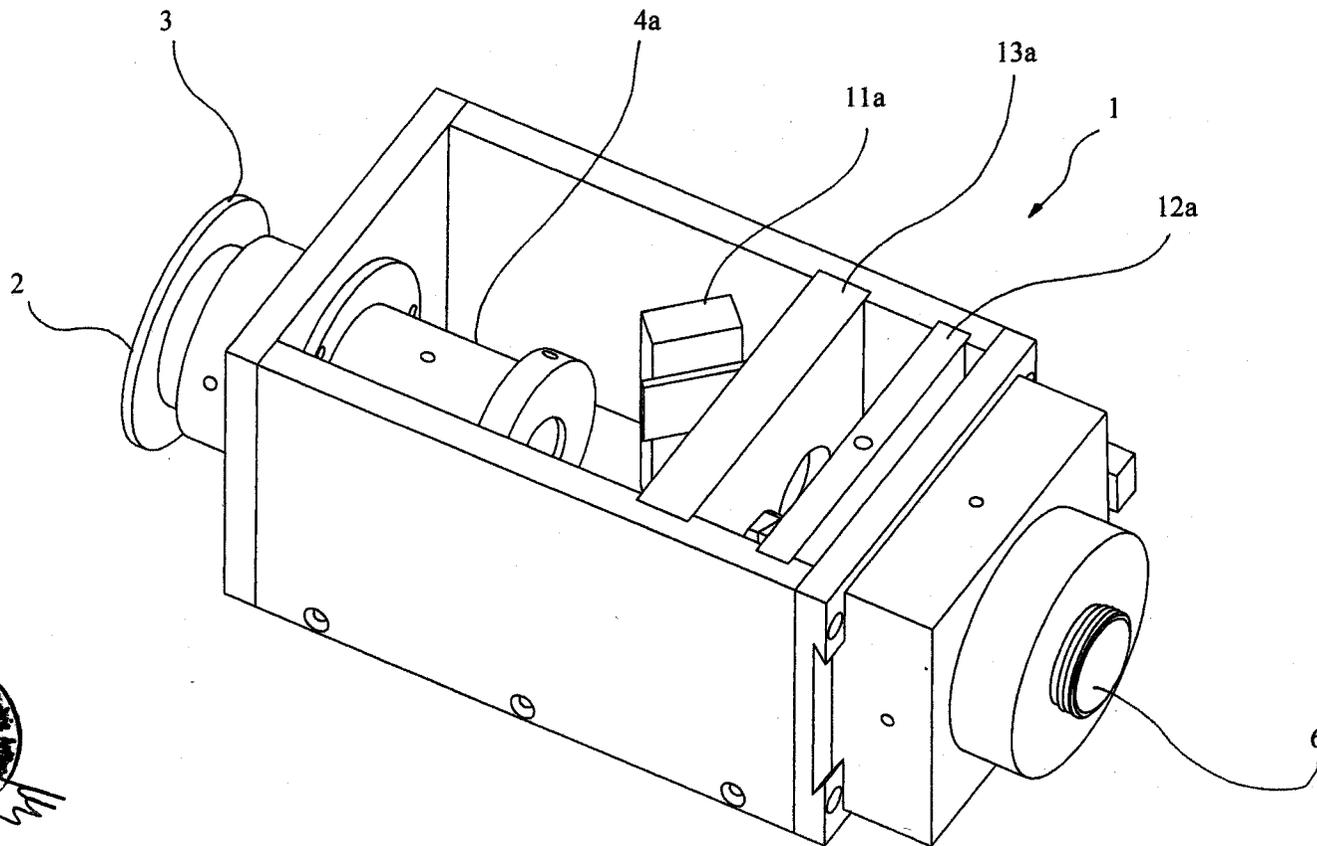
14. Duplicatore di immagini (1) secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, includente un sensore di rilevazione (15), coincidente con detto piano immagine (P2).

10

15. Duplicatore di immagini (1) secondo la rivendicazione 14, in cui detto sensore di rilevazione (15) è un sensore CCD.

**D.ssa Emma Montevocchi**  
N. Iscr. Albo 1119 B  
(in proprio e per gli altri)  
*Emma Montevocchi*

Fig. 1



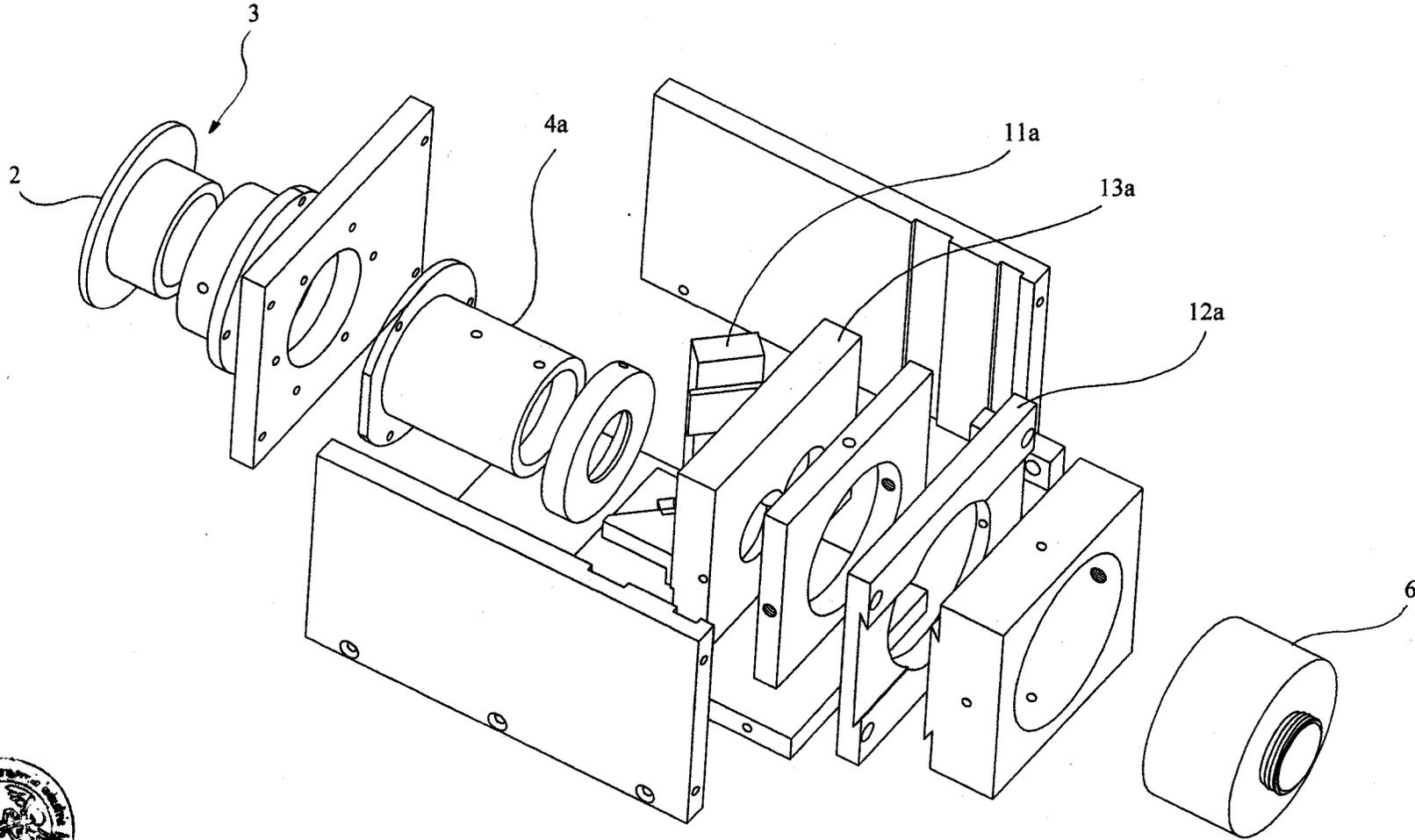
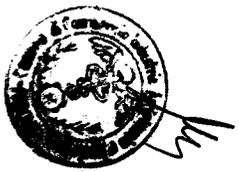


Fig. 2



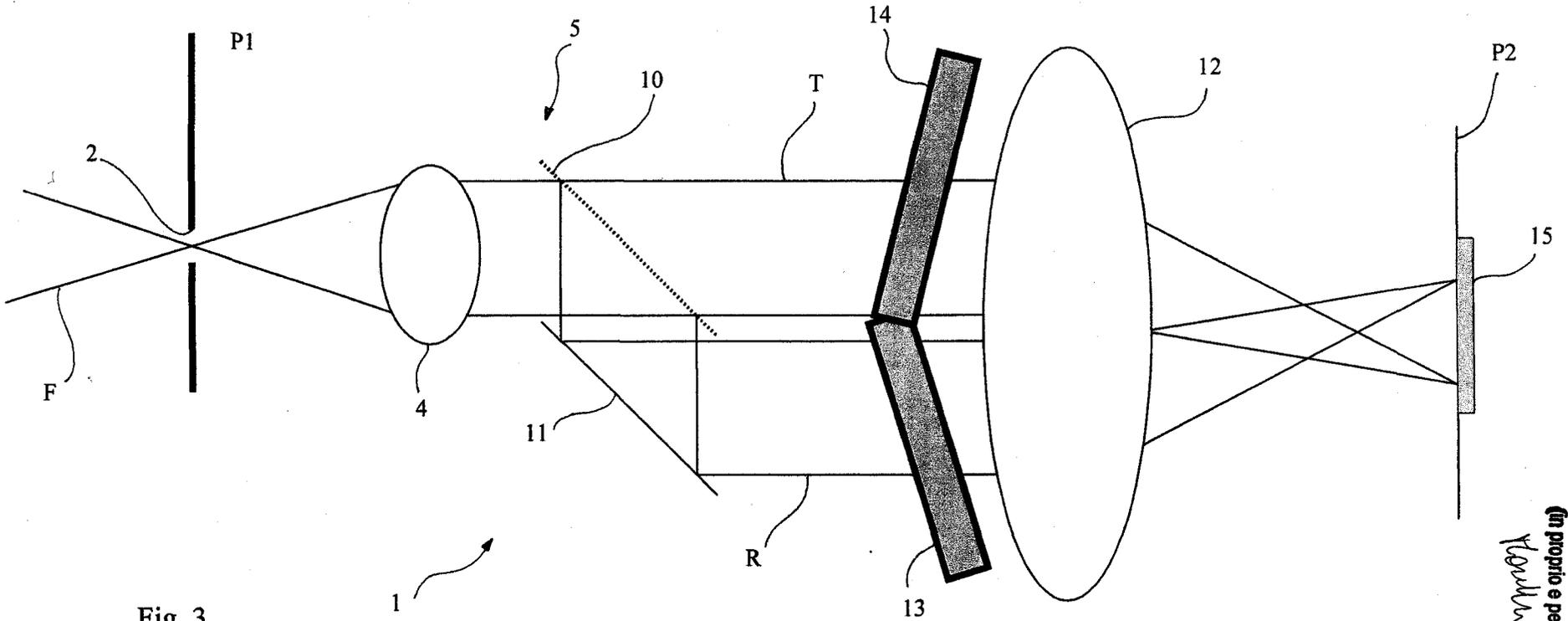


Fig. 3



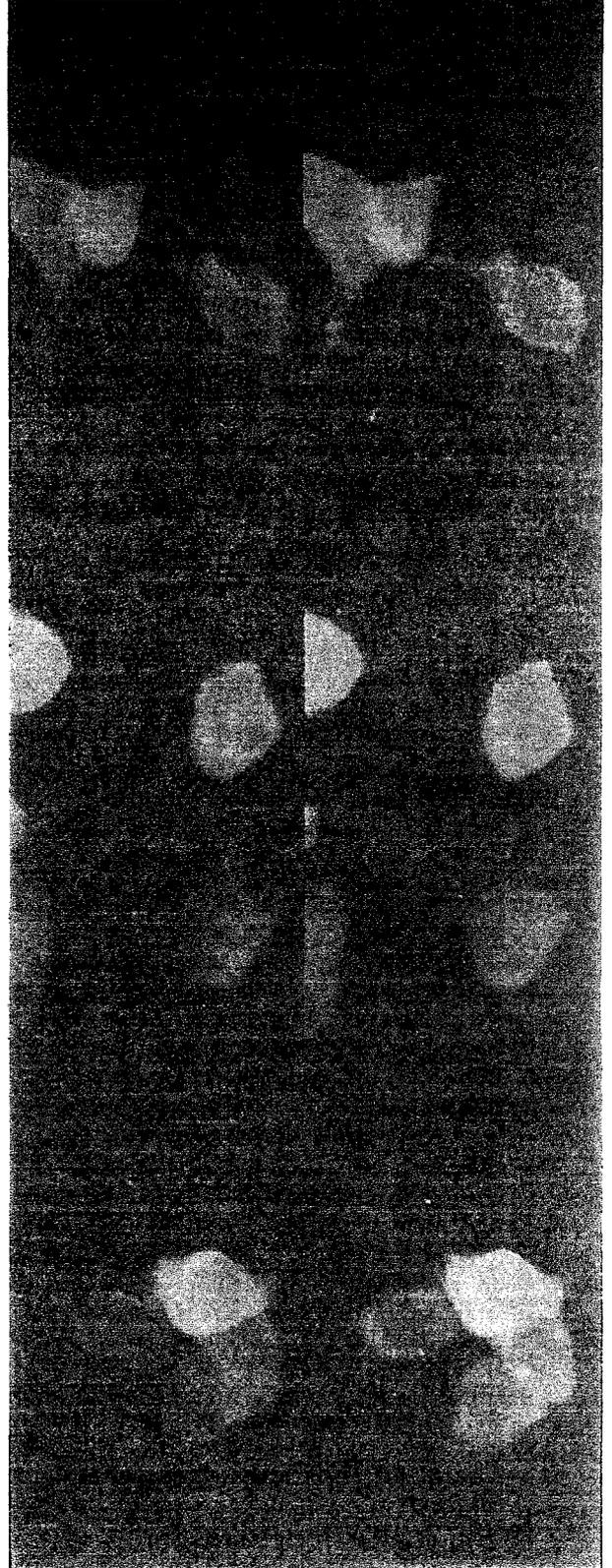
**D.ssa Emma Montevacchi**  
 N. Iscr. Albo 1119 B  
 (in proprio e per gli altri)  
*Montevacchi Emma*

*Vakew (rus)*



CFP

YFP



CFP

YFP

Fig. 4

