



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 871**

(51) Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 23/24 (2006.01)

G02B 23/26 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03755595 .0**

(96) Fecha de presentación : **11.07.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1523270**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

(54) Título: **Procedimiento y equipo de procesamiento de imágenes de fluorescencia de alta resolución por fibra óptica y particularmente de procesamiento de imágenes confocal.**

(30) Prioridad: **18.07.2002 FR 02 09099**
11.03.2003 FR 03 02972

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2010

(73) Titular/es: **MAUNA KEA TECHNOLOGIES**
9, rue d'Enghien
75010 Paris, FR

(72) Inventor/es: **Clade, Sophie;**
Berier, Frederic;
Viellerobe, Bertrand y
Genet, Magalie

(74) Agente: **Díaz Núñez, Joaquín**

ES 2 347 871 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

Procedimiento y equipo de procesamiento de imágenes de fluorescencia de alta resolución por fibra óptica y particularmente de procesamiento de imágenes confocal.

La presente invención se refiere a un procedimiento y un equipo de procesamiento de imágenes de fluorescencia fibrada de alta resolución, particularmente confocal. El campo de aplicación aludido es más particularmente el del procesamiento de imágenes *in vivo* e *in situ*.

La fluorescencia observada puede provenir de un compuesto exógeno (normalmente un marcador inyectado) o endógeno (presente en la célula) de un tejido biológico.

Más particularmente, el procedimiento de procesamiento de imágenes confocal según la invención es del tipo que consiste en barrer punto por punto un tejido en un plano subsuperficial, cada punto correspondiente a una señal de excitación emitida por una fuente continua, desviada e inyectada por turnos en una fibra óptica de un haz de fibras ópticas, luego enfocada a la salida de dicha fibra en dicho plano, cada punto emitiendo a cambio una señal de fluorescencia recogida por dicha fibra óptica, luego detectada y digitalizada para formar un elemento de imagen.

El carácter confocal se obtiene utilizando el mismo camino óptico, particularmente la misma fibra óptica que sirve de filtración espacial, para transportar la señal de excitación y la señal de fluorescencia emitida en reacción, y utilizando un sistema óptico que permita conjugar el punto de focalización en el tejido con dicha fibra óptica.

El equipo de procesamiento de imágenes confocal correspondiente comprende el haz de fibras ópticas flexibles (llamado corrientemente guía de imagen) con, a su extremo proximal:

- La fuente que emite continuamente a la longitud de onda de excitación de uno o varios fluoróforos dirigidos, normalmente una fuente láser;
- Medios de barrido rápido en el tiempo del haz de excitación producido por la fuente en líneas y en columnas en un plano XY correspondiente a la sección de entrada de la guía de imagen;
- Medios de inyección del haz de excitación en una de las fibras ópticas;
- Medios de detección de la señal de fluorescencia; y
- Medios de control, particularmente medios de barrido.

Medios que además están previstos para permitir la realización y la visualización de una imagen a partir de las señales detectadas sucesivamente sobre cada fibra.

En el extremo distal de la guía de imagen, se encuentra una cabeza óptica, destinada a ser puesta en contacto con el tejido observado, permitiendo enfocar el haz de excitación a una profundidad determinada (algunas decenas de μm) y entonces realizar una imagen subsuperficial.

En la práctica, este tipo de equipo presenta particularmente las ventajas siguientes:

- Por el lado distal de la guía de imagen se encuentra únicamente una óptica de focalización, que es menos frágil y costosa que una cabeza óptica que integra medios de barrido, la sustitución de la cabeza óptica que puede ser contemplada independientemente de los medios de barrido; por otro lado la cabeza es miniaturizable, lo que presenta un interés en endoscopia y también, de manera general, para aumentar la precisión de posicionamiento;
- Una guía de imagen hecha de fibras ópticas flexibles, sirve de brazo de acceso a la ubicación que hay que observar, lo que es importante para una aplicación *in situ*.

En el estado de la técnica, se describen los siguientes procedimientos y los equipos de fluorescencia.

En un artículo aparecido en "Applied Optics", Vol. 38, Núm. 34, Diciembre de 1999, páginas 7133-7144, se presenta un micro-endoscopio confocal utilizando un haz de fibras ópticas flexibles provisto en su extremo distal de una cabeza óptica en miniatura de focalización; está previsto barrer el haz de fibras ópticas en líneas, al comprender el equipo una hendidura de detección así como un detector lineal CCD del tipo de transferencia de cargas. Un equipo de este tipo permite obtener 4 imágenes/seg., lo que es demasiado lento para un procesamiento de imágenes *in situ* dependiendo de los movimientos del sujeto y del operador. Por otro lado, el hecho de barrer en líneas y no por puntos degrada el carácter confocal y conduce a una imagen peor resuelta.

En un artículo aparecido en "Optics Communications", 188 (2001), páginas 267-273, se presenta el acoplamiento de un microscopio confocal de mesa con barrido láser con un haz de fibras ópticas flexibles provisto en su extremo distal de una cabeza óptica en miniatura. El fin buscado es devolver el microscopio compatible con un endoscopio. La exploración se realiza fibra a fibra pero el microscopio de mesa utilizado es de concepción clásica, concebido

para visualizar una muestra fija sin preocuparse por el tiempo necesario a fin de obtener una imagen. Un tiempo de exposición de 2 segundos se adelanta en este artículo, demasiado largo para un procesamiento *in situ*, en tiempo real.

En el artículo "Development of tiene fiber-optic confocal microendoscope for clinical endoscopy", publicado en
 5 Proceedings of SPIE, Vol. 4613, páginas 244-253, 01.05.02, se presenta un microscopio confocal de fluorescencia con un haz de fibras ópticas que es barrido en líneas. El microscopio comprende un detector CCD que opera a una frecuencia de 3 MHz, y permite obtener 8 imágenes por segundo, las imágenes comprenden 512 x 512 píxeles.

La presente invención tiene por objeto proponer un procedimiento y un equipo de procesamiento de imágenes de
 10 fluorescencia fibrada de alta resolución, particularmente confocal, del tipo que utiliza una guía de imagen hecha de fibras ópticas barridas una por una por un haz de excitación emitido continuamente, dichos procedimiento y equipo permiten la visualización en tiempo real de una ubicación *in vivo in situ*, es decir capaz de proporcionar un número suficiente de imágenes punto por punto por segundo sin ser dependiente de movimientos del sujeto y del práctico facultativo para permitir particularmente un examen bastante rápido.

La presente invención también tiene como objeto proponer un procedimiento y un equipo que, de manera general, optimizan la calidad de cada imagen con el fin particularmente de obtener una excelente resolución lateral y axial. El procedimiento según la invención está definido en la reivindicación 1.

La presente invención propone una solución para realizar una imagen *in vivo in situ* en tiempo real. La invención
 20 está basada en el respeto del muestreo de las fibras (según el criterio de Shannon) que permite obtener y reconstruir una imagen punto por punto que corresponde bien a cada fibra. Esto permite no perder información preparando muestras del conjunto de las fibras una por una respetando un número medio mínimo de imágenes por segundo, a saber en la práctica 12 imágenes como mínimo por segundo para un modo máximo de 640 x 640 píxeles. La elección de la
 25 frecuencia de detección {banda pasante del detector) en función de esta preparación de muestras mínima permite luego para cada fibra detectar el número más grande y posible de fotones de fluorescencia.

Así, según un modo de realización posible, utilizando una guía de imagen de cerca de 30.000 fibras ópticas flexi-
 30 bles, la frecuencia de preparación de muestras y la banda pasante del sistema de detección (fotodiodo de avalancha o equivalente) se fijan sensiblemente sobre 1,5 MHz, correspondiendo aproximadamente a 12 píxeles por fibra, permitiendo entonces obtener por lo menos las 12 imágenes/seg. en modo máximo de 640 x 640 píxeles.

En la práctica, según un modo de realización ventajoso, que permite un escaneo rápido apropiado de las fibras para
 35 obtener una imagen en tiempo real, la desviación del haz se ajusta determinando una frecuencia de resonancia rápida de un espejo resonante "línea" y una frecuencia de resonancia lenta de un espejo galvanométrico "trama".

Según la invención, la duración de detección de un flujo procedente de una fibra está limitada en el tiempo y muy
 40 corta para respetar la adquisición de una imagen en tiempo real. Según la invención, se han previsto además medios de optimización para recoger y detectar el máximo de flujo procedente de la muestra durante esta duración de detección limitada, particularmente:

- se utilizan medios ópticos de desviación, de inyección, si llega el caso, de focalización y de detección presen-
 45 tando un grado de acromaticidad que depende de la desviación en longitud de onda entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda máxima de fluorescencia, así como de la anchura espectral de la señal de fluorescencia emitida; esto permite optimizar ventajosamente el flujo de fluorescencia recogido sobre toda la banda espectral de fluorescencia emitida;
- se escoge, si llega el caso, una abertura numérica de la óptica de focalización sobre el tejido comprendida
 50 sensiblemente entre 0,5 y 1, permitiendo obtener un buen compromiso entre la medida de campo y la cantidad recogida de fotones; y
- Se escoge un detector que tenga una eficacia cuántica en las longitudes de ondas de fluorescencia que hay que
 detectar por lo menos del 50%.

Según la invención, procesamiento de imagen realizado luego sobre el flujo detectado está también optimizado,
 55 para obtener una imagen de muy buena calidad a partir de este flujo limitado detectado de fotones. Esta optimización se realiza de la manera siguiente.

Se realizan una serie de etapas previamente a la adquisición de imágenes en tiempo real:

- una etapa de detección del emplazamiento de cada fibra de un conjunto escogido de fibras destinadas a ser
 60 utilizadas (o el conjunto de la guía de imagen, o un subconjunto escogido); esta etapa se tiene que realizar por lo menos a cada cambio de guía de imagen;
- una etapa de calibración del índice de inyección en cada fibra, es decir de definición de un índice de inyección
 65 propio de cada fibra; y
- una etapa de detección de la imagen de fondo (sin muestra).

ES 2 347 871 T3

En funcionamiento, la optimización del tratamiento de imagen comprende particularmente las etapas que consisten, después de la numeración de la señal detectada:

- en definir el flujo real recogido por cada fibra es decir que proviene sólo de la muestra, después corrección en función del índice de inyección propio de la fibra y de la sustracción de la imagen del fondo, para obtener una señal corregida;
- luego en efectuar una reconstrucción de la imagen a partir de esta señal corregida, con el fin de transformar particularmente una imagen que presenta un mosaico de fibras en una imagen sin fibras aparentes.

Según la invención, estas dos últimas etapas deben ser realizables en tiempo real. En cuanto a la corrección de la señal, ésta puede hacerse en tiempo real gracias a un tratamiento adaptado a la estructura de la señal observada y un algoritmo optimizado. En cuanto a la reconstrucción de la imagen, puede hacerse gracias a la elección de un número de operaciones por píxel realizables en tiempo real permitiendo obtener el resultado deseado en términos de calidad de imagen. Un filtrado gaussiano de paso bajo representa un buen compromiso entre la complejidad del tratamiento, la calidad del resultado y el tiempo de cálculo.

Para ganar tiempo y aumentar la complejidad del tratamiento correspondiente a la reconstrucción de la imagen, se puede aumentar también la capacidad de procesamiento del material, por ejemplo utilizando una carta de procesamiento específico y/o arquitectura paralela como un multiprocesador.

La invención presente también propone un equipo tal como y como se define en la reivindicación 13.

La invención presente será mejor comprendida y otras ventajas aparecerán a la vista de la descripción que va seguida de un ejemplo de realización, descripción hecha en referencia a los dibujos adjuntados sobre los cuales:

- La figura 1 representa esquemáticamente un ejemplo de realización de equipo de procesamiento de imágenes confocal de fluorescencia que comprende una cabeza de focalización;

- La figura 2 es un esquema funcional del equipo de la figura 1.

Según el ejemplo escogido y representado sobre las figuras 1 y 2, el equipo contiene:

- Una fuente de luz 1;
- Medios de configuración 2 del haz de excitación;
- Medios de separación 3 de longitudes de onda;
- Medios de exploración 4;
- Medios de inyección de haz 5;
- Una guía de imagen 6 constituida por fibras ópticas flexibles;
- Una cabeza óptica de focalización 7;
- Medios de rechazo 8 del haz de excitación;
- Medios de focalización 9 de la señal de fluorescencia;
- Medios de filtración espacial 10 de la señal de fluorescencia;
- Medios de detección 11 de la señal de fluorescencia; y
- Medios de procesamiento electrónico e informático 12 de la señal detectada de fluorescencia y de visualización.

Estos diferentes elementos son detallados a continuación.

La fuente de luz 1 es un láser que emite en una longitud de onda de excitación que permite excitar una gran gama de fluoróforos, por ejemplo 488 nm. Para optimizar la inyección en una de las fibras de la guía de imagen 6, el haz de excitación es circular para poder inyectar una fibra de sección también circular y, para optimizar el índice de inyección, el láser es preferentemente monomodo longitudinal para presentar el mejor frente de onda posible para la inyección en una fibra óptica débilmente multimodo. El láser emite de manera continua, y de manera estable (el ruido más débil posible, < 1%). La potencia de salida disponible es del orden de 20 mW. En calidad de ejemplos, se puede utilizar un láser de pozos cuánticos (VCSEL), un láser sólido bombeado por diodo, un diodo láser o incluso un láser de gas como el Argón.

En la salida de la fuente 1, están colocados los medios de configuración 2 del haz láser de excitación. Están constituidos por un sistema óptico afocal de engrandecimiento diferente de 1, compuesto por dos lentes L1 y L2 que permiten modificar el diámetro del haz láser. El engrandecimiento se calcula de modo que el diámetro del haz sea adaptado a los medios de inyección 5 en una fibra.

El haz láser de excitación devuelto obtenido es dirigido luego hacia los medios 3 previstos para separar las longitudes de ondas de excitación y de fluorescencia. Se trata por ejemplo de un filtro dicróico que tiene una eficacia de transmisión del 98 al 99% de la longitud de onda de excitación y que refleja pues sensiblemente las otras longitudes de onda. La señal de fluorescencia, tomando de regreso el mismo camino óptico que la señal de excitación (carácter confocal), será así enviada prácticamente totalmente hacia la vía de detección (8-11). Los medios de rechazo 8 colocados sobre la vía de detección sirven para eliminar totalmente las 1 al 2% reflexiones parásitas en la longitud de onda de excitación 488 nm que pasan hacia la vía de detección (por ejemplo un filtro de rechazo en 488 nm, un filtro pasa banda que permite por ejemplo sólo una transmisión entre 500 y 600 nm, o un filtro paso-alto que permite una transmisión por encima de 500 nm).

Los medios de barrido 4 repiten luego el haz de excitación. Según el ejemplo escogido y representado sobre la figura 1, estos medios comprenden un espejo M1 que resuena en 4 KHz que sirven para desviar el haz horizontalmente y entonces realizar las líneas de la imagen, de un espejo M2 galvanométrico en 15 Hz que sirve para desviar el haz verticalmente y entonces realizar la trama de la imagen; y de dos sistemas afocales de engrandecimiento unitario, AF1 situado entre ambos espejos y AF2 situado después del espejo M2, estos sistemas afocales se utilizan para conjugar los planos de rotación de ambos tipos de espejo M1 y M2 con plano de inyección en una de las fibras. Según la invención, la velocidad de barrido se determina para permitir una observación de los tejidos *in vivo in situ* en tiempo real. Para eso, el barrido debe ser bastante rápido para que haya por lo menos 12 imágenes/seg. visualizadas en la pantalla para un modo de visualización de 640 x 640 píxeles que correspondan al modo más lento. Para los modos de visualización que tengan menos píxeles, el número de imágenes adquiridas por segundo será superior así siempre a 12 imágenes/seg. Como variante, los medios de exploración pueden comprender particularmente un espejo rotativo, componentes integrados de tipo MEMs (espejos de barrido X e Y), o un sistema acústico-óptico.

El haz de excitación desviado en la salida de los medios de barrido es dirigido hacia los medios ópticos 5 con el fin de ser inyectado en una de las fibras de la guía de imagen 6. Estos medios 5 están constituidos aquí por dos conjuntos ópticos E1 y E2. El primer conjunto óptico E1 permite corregir en parte las aberraciones ópticas en el borde de campo de los medios de exploración 4, siendo la inyección así optimizada sobre el conjunto del campo óptico (tanto en el centro como en el borde). El segundo conjunto óptico E2 está destinado a realizar la inyección propiamente dicha. Su focal y su apertura numérica han sido escogidas para optimizar el índice de inyección en las fibras ópticas de la guía 6. Según un modo de realización que permite obtener el criterio de acromaticidad, el primer conjunto E1 está constituido por un doblete de lentes acromáticas, y el segundo conjunto E2 de dos dobletes de lentes acromáticas seguido por una lente situada cerca de la guía de imagen. Como variante, esta óptica de inyección podría estar constituida por cualquier otro tipo de ópticas estándares, como por ejemplo dos tripletes, o por lentes de gradiente de índice o bien de un objetivo de microscopio (no obstante más costoso).

La guía de imagen 6 está constituida por un gran número de fibras ópticas flexibles (algunas decenas de millares), por ejemplo 30.000 fibras de 2 μm de diámetro y espaciadas por 3,3 μm . En la práctica, se puede utilizar o el conjunto de las fibras de la guía de imagen, o un subconjunto escogido de estas fibras, por ejemplo centrado.

En la salida de la fibra óptica, el haz láser de excitación es enfocado por la cabeza óptica 7 en la muestra 13 en un punto 14 situado a una profundidad determinada situada entre algunas decenas de μm y una centena de μm , con relación a la superficie 15 de la muestra en cuyo contacto está destinada a ser colocada la cabeza óptica. Esta profundidad puede ser por ejemplo de 40 μm . La cabeza óptica permite pues enfocar el flujo saliente de la guía de imagen en la muestra, pero igualmente recoger el flujo de fluorescencia que vuelve de la muestra. La cabeza óptica posee un engrandecimiento de 2,4 y una apertura numérica sobre la muestra de 0,5. Estos dos parámetros son escogidos con el fin de que la señal de vuelta se haga únicamente en la fibra óptica que haya transmitido la señal de excitación y no en fibras adyacentes y conservar así la filtración confocal con ayuda de una fibra. Con estos valores de engrandecimiento y de apertura numérica, la resolución axial es del orden de 10 μm y la resolución lateral del orden de 1,4 μm . La apertura numérica se escoge también para optimizar el número de fotones recuperados que debe ser el más grande posible. La cabeza óptica puede estar constituida por ópticas clásicas (doblete, triplete, esférica) y/o de lentes de gradiente de índice (GRIN) y/o de lentes difractivas, presentando una calidad óptica y un cromatismo adaptados a la confocalidad, es decir minimizando las aberraciones ópticas, lo que llevaría sino particularmente a degradaciones sobre la profundidad de campo y por consiguiente sobre la resolución axial del equipo. En funcionamiento, la cabeza óptica está destinada a ser puesta en contacto con la muestra 13. Esta última es un tejido biológico o un cultivo celular. La expresión de la fluorescencia se realiza o por un fluoróforo que se inyecta (fluorescencia sistémica), o por un fluoróforo fabricado por la misma célula por modificación de un gen (fluorescencia transgénica). En estos dos casos, el fluoróforo remite fotones sobre una banda espectral más o menos grande que puede ir de una decena de nanómetros a más de una centena de nanómetros.

Sobre la vía de detección, la señal de fluorescencia, en la salida del filtro de rechazo 8, es enfocada luego por los medios 9, constituidos por ejemplo por una lente de detección, en un orificio de filtración de los medios de filtración espacial 10. El/La focal de la lente de detección se calcula para que la señal de fluorescencia que provenga de una fibra sea de la medida o ligeramente inferior a la del orificio de filtración. Este último permite conservar la luz de

ES 2 347 871 T3

fluorescencia que proviene sólo de la fibra iluminada por el haz incidente. Permite rechazar la luz que habría podido ser acoplada en las fibras adyacentes a la que está iluminada. La medida del orificio se calcula para que la imagen de una fibra quepa perfectamente en ella. En este caso, es de 20 μm . Por otro lado, siempre en vías de optimizar la cantidad de fotones que atraviesan el orificio de filtración, y pues el flujo detectado, los medios de barrido 4, los medios de inyección 5, los medios de focalización 7 de la cabeza óptica, y los medios de detección 8, 9 y 10 son adaptados al fluoróforo detectado: estos medios son escogidos por ser bastante acromáticos para recoger fotones sobre la banda más ancha de emisión del fluoróforo.

Los medios de detección 11 tienen una sensibilidad máxima en las longitudes de onda de fluorescencia estudiadas. Se puede utilizar por ejemplo un fotodiodo de avalanchas (APD) o bien un fotomultiplicador. Por otro lado, según la invención, la banda pasante se escoge para optimizar el tiempo de integración de la señal de fluorescencia. Es de 1,5 MHz, lo que corresponde a la frecuencia mínima de muestreo de la guía de imagen con un tiempo de integración optimizado sobre cada píxel.

Los medios de guía electrónicos e informáticos 12 de control, de análisis y de tratamiento numérico de la señal detectada y de visualización comprenden las cartas siguientes:

- Una carta de sincronización 20 que tiene como funciones:

- controlar de una manera sincronizada el barrido, es decir el movimiento de los espejos línea M1 y trama M2;

- conocer en cualquier momento la posición del spot láser así explorado; y

- administrar todas las demás cartas a través de un microinspector mismo que puede ser dirigido;

- Una carta detector 21 que comprende un circuito analógico que realiza particularmente una adaptación de impedancia, un convertidor analógico numérico luego un componente lógico programable (por ejemplo un circuito FPGA) que conforma la señal;

- Una carta de adquisición numérica 22 que permite tratar un flujo de datos numéricos a frecuencia variable y fijarlo sobre una pantalla 23;

- Una tarjeta gráfica 24.

Como variante, se puede utilizar una sola carta que reagrupa los caracteres funcionales de estas diferentes cartas.

El procesamiento de imagen se hace de la manera siguiente.

Al colocar una guía de imagen en el equipo, una primera operación se efectúa para reconocer el motivo de las fibras en la guía de imagen, y conocer luego el emplazamiento real de cada fibra destinada a ser utilizada.

Se realizan también las operaciones siguientes previamente a la utilización del equipo:

- La determinación del índice de inyección propio de cada fibra, con la ayuda de una muestra homogénea, este índice de inyección puede variar de una fibra a otra; y

- La medida de la imagen de fondo, efectuada sin muestra.

Estas dos operaciones pueden ser realizadas regularmente según la frecuencia de utilización del equipo. Los resultados obtenidos van a ser utilizados para corregir en funcionamiento la señal numérica en la salida de la carta detector.

En funcionamiento, según la invención 2 grupos de tratamientos son efectuados sobre la señal numérica en salida de la carta detector:

El primer grupo consiste en un primer tiempo en corregir la señal numérica particularmente para tener en cuenta el índice propio real de inyección de la fibra de la que proviene dicha señal y para sustraerle la parte del flujo correspondiente a la imagen de fondo. Esto permite tratar sólo una señal que corresponde realmente a la muestra observada. Se utiliza para este grupo de tratamiento un algoritmo de cálculo clásico que es optimizable para respetar la restricción del tiempo real.

El segundo grupo consiste luego, a partir de la señal corregida, en reconstruir la imagen numérica que será visualizada por el práctico facultativo. El fin del tratamiento efectuado es ofrecer a la visualización una imagen numérica reconstituida que no sea simplemente un mosaico de elementos de imagen correspondiente cada uno a una señal numérica corregida de una fibra colocada una al lado de la otra, sino ofrecer una imagen numérica reconstituida que haga desaparecer las fibras. Para esto se utiliza un algoritmo destinado a efectuar un cierto número de operaciones sobre cada píxel, el algoritmo se escoge para respetar la restricción de tiempo real, es decir que debe representar un

buen compromiso entre la complejidad de las operaciones deseadas, la calidad del resultado que se puede obtener y el tiempo de cálculo. En calidad de ejemplo, se puede utilizar un algoritmo de filtrado gaussiano de paso bajo.

El funcionamiento del equipo es el siguiente. La fuente 1 produce un haz paralelo circular de excitación en una longitud de onda de 488 nm, que luego es configurado en el sistema afocal 2 con el fin de darle la medida adecuada para la mejor inyección posible en el núcleo de una fibra. Este haz es enviado luego hacia el sistema de separación dicróica 3 que refleja la longitud de onda de excitación. El haz incidente es luego desviado angularmente en el tiempo en ambas direcciones del espacio por el sistema de barrido optomecánico de espejos 4, e inyectado gracias a los medios ópticos de inyección 5 en una de las fibras de la guía de imagen 6. Los medios electrónicos 12 sirven para controlar la inyección en un instante determinado de una de las fibras ópticas de la guía de imagen desviando angularmente el haz por medio de los espejos, y este punto por punto para una línea determinada, y línea tras línea, para constituir la imagen. En la salida de la guía, la luz que emerge de la fibra inyectada es enfocada en la muestra gracias a la cabeza óptica 7 en un punto situado en una profundidad determinada situada sensiblemente entre algunas decenas de μm y una centena de μm . Gracias al barrido, la muestra es iluminada punto por punto. A cada instante, el spot que ilumina el tejido emite entonces una señal de fluorescencia que tiene la particularidad de ser desviada hacia longitudes más grandes de onda. Esta señal de fluorescencia es captada por la cabeza óptica 7, luego sigue el camino inverso del haz de excitación hasta el filtro dicróico 3 que va a transmitir la señal de fluorescencia hacia la vía de detección. Las reflexiones parásitas que se producen en la longitud de onda de excitación van luego a ser rechazadas por el filtro de rechazo 8. Finalmente, la señal de fluorescencia es enfocada en el orificio de filtración 10 para seleccionar sólo la luz que proviene de la fibra excitada y los fotones son detectados por el fotodiodo de avalancha 11. La señal detectada es luego digitalizada y corregida. Las señales detectadas, unas después de las otras, son tratadas en tiempo real gracias al tratamiento de imagen descrito más arriba para permitir la reconstrucción de una imagen en tiempo real visible en la pantalla.

La guía de imagen 6 utilizada para este equipo puede estar compuesta sensiblemente de 5.000 a 100.000 fibras ópticas flexibles, según el diámetro exterior de la guía que se desea, que siendo la misma función de la aplicación aludida (endoscopia, medida de campo deseado, etc.). Puede tratarse por ejemplo de guías de imágenes comercializadas por la sociedad FUJIKURA. El diámetro de núcleo de las fibras está preferentemente comprendido entre 1 y 4 μm . Esto conduce a una divergencia de haz en la salida de la fibra que presenta un ángulo de aproximadamente 18° para una apertura numérica de 0,42 en el aire. Un diámetro de núcleo de 1 μm puede ser obtenido gracias a un procedimiento de estiramiento del extremo del conjunto de la guía de imagen. El extremo de la guía 6 es pulido y no contiene medios ópticos. El pulimento tiene por objeto conferir el mismo estado de superficie a la cara de la guía y entonces sobre las fibras desnudas en contacto con el tejido para, por una parte que el fondo de la imagen obtenido sea lo más homogéneo posible y, por otra parte, para suprimir los eventuales problemas de adherencia de las fibras con tejido que correría peligro de estropearlo. El pulimento puede ser plano o redondeado para encajar con la forma del tejido. La apertura numérica de cada fibra óptica es preferentemente escogida como más la grande posible para recoger el máximo de fotones de fluorescencia, es decir por ejemplo de 0,42. La distancia entre núcleos confiere la resolución lateral de la imagen obtenida (distancia entre dos puntos de la imagen). Cuanto más pequeña sea esta distancia, mejor será la resolución, en cambio esto se hará en detrimento de la medida del campo que hay que convertir en imágenes. Conviene entonces encontrar un buen compromiso entre el número de fibras de la guía y la distancia entre núcleos entre las fibras para obtener una buena resolución lateral (entre 2 y 8 μm) con una medida de campo apropiada para observar los elementos de los elementos tisulares deseados.

Dos ejemplos de guías que pueden convenir según la invención se dan a continuación:

	Ejemplo 1	Ejemplo 2
Número de fibras	6000	30 000
Diámetro del campo procesado	300 μm	650 μm
Diámetro exterior de la guía	330 μm	750 μm
Diámetro de núcleo de una fibra	3 μm	1,9 μm
Distancia entre núcleos	4 μm	3,3 μm
Profundidad máxima de integración de la señal desde la superficie (esquematizada por el plano P sobre la figura 1) o resolución axial	15-20 μm	10-15 μm
Resolución lateral	4 μm	3,3 μm

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para realizar una imagen confocal de fluorescencia *in vivo in situ*, el procedimiento utiliza una
 5 guía de imagen hecha de varios millares de fibras ópticas y consiste en barrer punto por punto un tejido en un plano
 subsuperficial, cada punto correspondiente a una señal de excitación emitida por una fuente continua, desviada e
 inyectada en una de las fibras ópticas de dicho haz luego enfocada a la salida de dicha fibra en dicho plano, cada punto
 emitiendo de vuelta una señal de fluorescencia recogida por dicha fibra óptica, luego detectada y digital izada para
 formar un elemento de imagen, el procedimiento comporta las siguientes etapas:
 10
 - se desvía la señal de excitación a una velocidad que corresponde a la adquisición de un mínimo de 12 imágenes
 por segundo en el caso de un modo de visualización máxima de 640 x 640 píxeles,
 - se detecta la señal de fluorescencia a una frecuencia de detección superior o igual a una frecuencia mínima de
 15 preparación de muestreo de las fibras una por una que es sensiblemente igual a 1,5 MHz para dicho mínimo de
 12 imágenes por segundo en el caso de un modo de visualización de 640 x 640 píxeles.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por una abertura numérica de la óptica de focalización
 20 comprendida sensiblemente entre 0,5 y 1.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por que se ajusta una velocidad de
 desviación del haz de excitación determinando una frecuencia de resonancia rápida de un espejo línea resonante y una
 frecuencia de resonancia lenta de un espejo trama galvanométrico.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por que se utilizan medios ópticos
 de desviación, de inyección, de focalización y de detección que presentan un grado de acromaticidad que permite
 recoger fotones sobre toda la anchura de la banda de emisión del fluoróforo excitado.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por una eficacia cuántica de la
 detección en las longitudes de ondas de fluorescencia que hay que detectar de al menos el 50%.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por una etapa previa de detección
 del emplazamiento de las fibras de la guía de imagen destinadas a ser utilizadas.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por una etapa previa de determi-
 nación del índice real de inyección propio de cada fibra.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por una etapa previa de determi-
 40 nación del flujo recogido correspondiente a la imagen de fondo.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado** por una etapa de corrección de la señal digital
 izada procedente de una fibra por sustracción del flujo correspondiente a la imagen de fondo y adaptación al índice
 real de inyección propio de dicha fibra.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** por una etapa de reconstrucción de la imagen a partir
 de la señal corregida.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** por que la etapa de reconstrucción de imagen com-
 50 prende un filtrado gaussiano de paso bajo.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por que la señal de
 excitación está adaptada a un fluoróforo de tipo endógeno del tejido celular,
- 55 13. Equipo de procesamiento de imágenes de fluorescencia confocal fibrada *in vivo in situ* para la puesta en apli-
 cación del procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
 - una guía de imagen (6) que comprende varios millares de fibras ópticas;
 - 60 - una fuente (1) que emite continuamente en la longitud de onda de excitación por lo menos de un fluoróforo
 dirigido,
 - medios de barrido (4) y de inyección (5) fibra por fibra en el tiempo del haz de excitación producido por la
 fuente (1) en líneas y en columnas en un plano XY correspondiente a la sección de entrada de la guía de imagen
 65 (6);
 - medios de separación (3) de la longitud de onda de excitación y de las longitudes de onda de fluorescencia;

- medios de detección (11) de la señal de fluorescencia; y
- medios de tratamiento (12) de la señal detectada permitiendo la realización de una imagen;

- 5 en el extremo distal está colocada una cabeza óptica (7), destinada a ser puesta en contacto con el tejido observado (13), que permite enfocar el haz de excitación, los medios de exploración están adaptados a desplazar el haz de excitación a una velocidad que corresponde a la obtención de un mínimo de 12 imágenes por segundo en el caso de un modo de visualización máxima de 640 x 640 píxeles; y
- 10 los medios de detección presentan una banda pasante cuya frecuencia es superior o igual a una frecuencia mínima de preparación de muestreo de las fibras una por una que es igual a 1,5 MHz para dicho mínimo de 12 imágenes por segundo en el caso de un modo de visualización de 640 x 640 píxeles.
- 15 14. Equipo según la reivindicación 13, **caracterizado** por que el haz de excitación producido por la fuente (1) es monomodo longitudinal que presenta una calidad de frente de onda óptima para la inyección en una fibra óptica débilmente multimodo.
- 20 15. Equipo según la reivindicación 13 ó 14, **caracterizado** por que la sección de una fibra es circular, el haz de excitación producido por la fuente es circular para optimizar la inyección en una fibra.
- 25 16. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizado** por medios de configuración (2) del haz utilizados en la salida de la fuente (1) para configurar el haz de excitación con el fin de adaptarlo a los medios de inyección (5) en la guía de imagen (6).
- 30 17. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 16, **caracterizado** por que los medios para separar las longitudes de onda de excitación y de fluorescencia comprenden un filtro dicróico (3) que tiene un máximo de eficacia en la longitud de onda de excitación.
- 35 18. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 17, **caracterizado** por medios de rechazo (8) colocados previamente a los medios de detección (11) y adaptados para eliminar la longitud de onda de excitación.
- 40 19. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 18, **caracterizado** por que los medios de exploración (4) comprenden un espejo línea resonante (M1), un espejo galvanométrico trama (M2), un primer sistema óptico afocal (AF1) de engrandecimiento unitario que permite conjugar ambos espejos y un segundo sistema afocal (AF2) de engrandecimiento unitario que permite conjugar los planos de rotación de ambos espejos con el plano de inyección en una de las fibras.
- 45 20. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 19, **caracterizado** por que los medios ópticos de la cabeza óptica (7), los medios de barrido (4), los medios de inyección (5) y los medios de detección presentan un grado de acromatización que permite recoger fotones sobre toda la anchura de la banda espectral de la señal de fluorescencia.
- 50 21. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 20, **caracterizado** por que los medios de inyección (5) comprenden dos conjuntos ópticos (E1, E2), el primer conjunto (E1) está adaptado para corregir las aberraciones ópticas en reborde de campo de los medios de barrido (4) y el segundo conjunto (E2) está adaptado para realizar la inyección propiamente dicha en una de las fibras de la guía de imagen (6).
- 55 22. Equipo según la reivindicación 21, **caracterizado** por que el primer conjunto óptico (E1) comprende un doblete y el segundo conjunto óptico (E2) comprende dos dobletes seguido de una lente.
- 60 23. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 22, **caracterizado** por un orificio de filtración (10) colocado antes de los medios de detección (11) cuyo diámetro se escoge para que la imagen de una fibra se inscriba en él.
- 65 24. Equipo según la reivindicación 23, **caracterizado** por medios de focalización (9) de la señal de fluorescencia sobre el orificio de filtración (10).
25. Equipo según una de las reivindicaciones 13 a 24, **caracterizado** por que la fuente está adaptada para excitar un fluoróforo endógeno presente en el tejido celular.

FIG.1



