

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 432**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2021** **PCT/EP2021/068661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2022** **WO22017784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2021** **E 21748511 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 4185914**

54 Título: **Sistemas y procedimientos de análisis microscópico de una muestra**

30 Prioridad:

22.07.2020 FR 2007700

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

26.11.2024

73 Titular/es:

DAMAE MEDICAL (100.0%)
14 rue Sthrau
75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

OGIEN, JONAS y
LEVECQ, OLIVIER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 989 432 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

Sistemas y procedimientos de análisis microscópico de una muestra

Campo técnico de la invención

5 La presente descripción se refiere a sistemas y procedimientos para el análisis microscópico de una muestra, y en particular se refiere al análisis microscópico de un tejido biológico, en particular piel.

Estado de la técnica

10 En el contexto de un examen dermatológico en particular, se conoce la realización de un examen dermatoscópico, es decir, una visualización de la superficie de la piel mediante un instrumento óptico de aumento, seguida de un análisis microscópico local en función de las observaciones realizadas en la imagen de campo amplio obtenida por el examen dermatoscópico. El análisis microscópico incluye, por ejemplo, imágenes microscópicas o análisis espectroscópicos.

15 Las técnicas de formación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, técnicas de microscopía confocal como, por ejemplo, la técnica descrita en Raj adhyaksha *et al* [Ref. 1] o K. König *et al* [Ref 2] para microscopía no lineal. También se conocen técnicas de microscopía de coherencia óptica (u OCM según la expresión anglosajona "*Optical Coherence Microscopy*"), ya sea en el dominio del tiempo ("*Time Domain OCM*") o en el dominio de la frecuencia ("*Frequency Domain OCM*"). Las técnicas OCM incluyen una combinación de tomografía de coherencia óptica y microscopía confocal (véase, por ejemplo, Schmitt *et al* [Ref. 3]) para mejorar la resolución lateral.

20 Más concretamente, la solicitud de patente WO2015092019 [Ref. 4] describe una técnica para visualizar la estructura interna de un objeto semitransparente dispuesto en el foco del objetivo de un microscopio, por ejemplo un tejido biológico, con el fin de obtener secciones verticales o "*B-Scans*" ortogonales a la superficie del objeto, a gran velocidad (varias secciones por segundo), con una alta resolución espacial, es decir, del orden de 1 μm , tanto axial como lateralmente, y una profundidad de penetración satisfactoria, del orden de un milímetro. Esta técnica se basa en la microscopía de coherencia óptica, pero presenta una configuración de filtrado confocal lineal o unidimensional (en una dirección); para lograrlo, la línea de iluminación se conjuga ópticamente, en particular mediante el objetivo del microscopio, con un detector lineal cuya zona de detección tiene una anchura sustancialmente idéntica a la anchura de la imagen de la línea, lo que da lugar al filtrado espacial de una región del objeto que debe observarse. Esta técnica se conoce como LC-OCT (*Line-field Confocal Optical Coherence Tomography*).

25 El artículo de Y. Chen *et al.* [Ref. 5] también ha propuesto un dispositivo de microscopía de tomografía de coherencia óptica de barrido lineal, pero en el que una muestra se mueve en un plano perpendicular a un eje óptico del objetivo del microscopio, y en una dirección perpendicular a la línea de iluminación, lo que permite formar imágenes *delante* de la muestra (o "*C-Scans*").

30 Las técnicas de análisis espectroscópico de una muestra, y en particular de un tejido biológico como la piel, incluyen, entre otras, la espectroscopia Raman, que permite formar una huella molecular de un tejido biológico, como se describe, por ejemplo, en Schleusener *et al.* [Ref. 6]. El artículo de revisión de E. Drakaki *et al.* la [Ref. 7] presenta una visión general de las diferentes técnicas de espectroscopia aplicadas al análisis microscópico de la piel.

35 Todas las técnicas de análisis microscópico descritas anteriormente, ya sea para imágenes o espectroscopia, utilizan un objetivo de microscopio con una gran apertura numérica nominal, típicamente mayor o igual a 0,5, para un campo de visión determinado, típicamente entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 1,5 mm.

40 En la práctica, para obtener información relevante durante el análisis microscópico, es importante que el profesional encuentre, durante el análisis microscópico, la zona que parecía sospechosa en la imagen obtenida durante el examen dermatoscópico.

Sin embargo, localizar con precisión una zona sospechosa identificada mediante dermatoscopia utilizando el análisis microscópico es complejo, porque las imágenes en las que es posible basar la visualización se obtienen sobre campos mucho más pequeños que en dermatoscopia, y tienen un aspecto muy diferente. Esto es aún más crítico cuando el análisis microscópico no produce imágenes, como la microespectroscopia Raman.

45 Se han propuesto varias soluciones para permitir a un profesional identificar el campo de análisis microscópico en la imagen dermatoscópica.

50 La solicitud de patente WO2017139712 [Ref. 8] por ejemplo, describe un sistema en el que se combinan la microscopía confocal (o RCM según la abreviatura de la expresión anglosajona "*réflectance confocal microscopy*") y la dermatoscopia de campo amplio (o WFD según la abreviatura de la expresión anglosajona "*widefield dermoscopy*"). Para ello, se integra una microcámara directamente en el objetivo del microscopio para formar una imagen de reflexión de campo amplio de la superficie. Sin embargo, este sistema es complejo de fabricar e integrar, y las imágenes obtenidas por la microcámara son de calidad mediocre.

La Patente US7864996 [Ref. 9] describe un sistema de imagen confocal acoplado a un dermatoscopio. El dermatoscopio está montado en un módulo fijado a la piel y permite obtener imágenes de la misma zona que el microscopio confocal, que puede fijarse al mismo módulo. Se adquiere una imagen dermatoscópica (o "macroscópica"), seguida de imágenes confocales. Se realiza una correlación precisa entre las imágenes para representar en la imagen dermatoscópica la posición de la imagen formada por el sistema de imagen confocal. Sin embargo, el sistema descrito requiere un módulo adicional para acoplar dos sondas separadas, ya que es difícil acoplar este módulo en cualquier parte de la piel. Además, para obtener una correlación entre las imágenes dermatoscópicas y confocales debe seguirse un procedimiento complejo para la adquisición de imágenes.

En microespectroscopia Raman, se describe en Z. Wu *et al.* [Ref 10] cómo adquirir y localizar señales micro-Raman en tejidos mediante imágenes de microscopía de reflexión confocal, utilizando una única fuente láser. Sin embargo, una imagen confocal es menos fácil de utilizar como imagen de referencia para un profesional que una imagen dermatoscópica.

La presente descripción propone dispositivos y procedimientos de análisis microscópico que ofrecen al usuario la posibilidad de localizar con precisión, mediante un proceso de adquisición sencillo, el campo de análisis microscópico en una imagen de reflexión de superficie de campo amplio, cuya calidad de imagen se aproxima a la calidad de una imagen dermatoscópica.

Sumario de la invención

En la presente descripción, el término "comprender" significa lo mismo que "incluir", "contener", y es inclusivo o abierto y no excluye otros elementos no descritos o representados. Además, en la presente descripción, el término "aproximadamente" o "sustancialmente" es sinónimo de (significa lo mismo que) un margen de menos y/o más del 10%, por ejemplo el 5%, del valor respectivo.

Según un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un sistema para el análisis microscópico de una muestra que comprende:

- un canal de análisis microscópico que comprende:

- un objetivo de microscopio con una apertura numérica nominal determinada en un campo de visión dado;
- un canal de iluminación configurado para iluminar la muestra a través del objetivo del microscopio según un primer patrón de iluminación y en una primera banda espectral;
- un canal de detección que comprende dicho objetivo de microscopio, estando dicho canal de detección configurado para detectar en dicho campo de visión y de acuerdo con un patrón de detección, un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra y generar una señal de detección;
- una unidad de procesamiento configurada para generar información para el análisis microscópico de la muestra a partir de dicha señal de detección;

- un canal de visualización que comprende:

- dicho objetivo de microscopio;
- un dispositivo de iluminación de campo completo configurado para iluminar la muestra en una segunda banda espectral;
- un detector bidimensional,
- uno o más elementos de formación de imágenes que forman, con dicho objetivo de microscopio, un dispositivo de formación de imágenes de campo completo configurado para conjugar ópticamente un campo efectivo dado de la muestra que abarca dicho campo de visión con un área de detección del detector bidimensional, y para formar una imagen de visión de reflexión superficial de dicho campo efectivo;

- un elemento divisor de haz dispuesto aguas arriba del objetivo del microscopio para separar el canal de análisis y el canal de visualización;

- un módulo de representación configurado para representar dicha imagen de visualización y, en dicha imagen de visualización, un elemento de imagen que indique la posición de dicho patrón de detección. En la presente descripción, se entiende por "campo de visión" del objetivo del microscopio una región de un plano focal del objetivo del microscopio situada en el espacio objeto (espacio muestra) para la que el fabricante garantiza una apertura numérica nominal. Una apertura numérica nominal está, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,4, por ejemplo entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,9. El campo de visión puede definirse mediante un círculo con un diámetro comprendido entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 5 mm, por ejemplo entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 1,5 mm.

Se denomina "campo efectivo" del objetivo del microscopio, un campo en el espacio del objeto (espacio de la muestra) que está incluido en un campo total del objetivo del microscopio, que abarca dicho campo de visión y cuyas dimensiones están limitadas por el dispositivo de formación de imágenes de campo completo del canal de visualización. El campo efectivo puede definirse mediante un círculo con un diámetro comprendido entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 10 mm, por ejemplo entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 5 mm.

En la presente descripción, el patrón de iluminación depende del canal de iluminación del canal de análisis microscópico y puede comprender un punto de iluminación, una línea de iluminación o una superficie de iluminación, por ejemplo una superficie rectangular resultante de escanear un punto de iluminación o una línea de iluminación. Un punto de iluminación se define más precisamente como el patrón de difracción resultante del enfoque, por el objetivo del microscopio del canal de análisis microscópico, de un haz de luz colimado que incide sobre dicho objetivo. El patrón de iluminación también puede incluir una superficie de iluminación que no resulte del barrido, por ejemplo una superficie con una geometría circular, en el caso de un canal de análisis microscópico de campo completo. El haz de luz emitido por la muestra en respuesta a la iluminación de la misma puede ser un haz reflejado, un haz retrodispersado o el resultado de un proceso de emisión a otra longitud de onda (por ejemplo, fluorescencia, dispersión Raman, etc.)

Además, el patrón de detección está incluido en el campo de visión y está incluido en el patrón de iluminación o es del mismo orden de magnitud, y depende del canal de detección del canal de análisis microscópico. El patrón de detección puede comprender un punto de detección, una línea de detección o una superficie de detección, por ejemplo una superficie rectangular resultante del barrido de una línea o, en el caso de un canal de análisis microscópico de campo completo, una superficie ópticamente conjugada con un área de detección de un detector. Un punto de detección se define aquí en el espacio del objeto por una zona elemental conjugada ópticamente con un detector elemental de un detector del canal de detección del canal de análisis microscópico.

El depositante ha demostrado que el sistema de análisis microscópico de una muestra según el primer aspecto permite a un usuario localizar con precisión el campo de análisis microscópico en una imagen de reflexión de superficie de campo amplio, o "imagen a simple vista". Esta imagen de reflexión superficial de campo amplio puede tener una calidad de imagen cercana a la de una imagen dermatoscópica porque el canal de visualización está desplazado. Sin embargo, el sistema sigue siendo muy compacto en comparación con los sistemas más avanzados que requieren dos sondas ([Ref 9], por ejemplo).

Según una o más realizaciones, el dispositivo de formación de imágenes de campo completo del canal de visualización tiene, en el espacio objeto del objetivo del microscopio, una apertura numérica estrictamente menor que la apertura numérica nominal del objetivo del microscopio. De este modo, es posible beneficiarse por el canal de visualización de un campo de visión efectivo mayor que el campo de visión, limitando al mismo tiempo las aberraciones y el vifeteado potencial, y manteniendo unas dimensiones limitadas para el elemento o elementos de imagen que forman el dispositivo de imagen de campo completo. Por tanto, se ha mejorado aún más la calidad de la imagen de visualización.

Según una o más realizaciones, dicho canal de visualización comprende además un diafragma para limitar la apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo. In other embodiments, it is directly one of said imaging elements forming the full-field imaging device that is configured to further form a diaphragm for limiting the numerical aperture of the full-field imaging device.

Según una o más realizaciones, el dispositivo de formación de imágenes de campo completo de dicho canal de visualización es ajustable en enfoque. Esto hace posible formar una imagen de visualización en reflexión de la superficie de la muestra incluso cuando el canal de análisis microscópico obtiene imágenes en profundidad de la muestra (como en el caso de las imágenes OCM, por ejemplo).

Según una o más realizaciones, el dispositivo de iluminación de campo completo del canal de visualización comprende una pluralidad de fuentes de luz dispuestas en una periferia de una cara distal del objetivo del microscopio, es decir, la cara del objetivo del microscopio en el espacio de la muestra. Esta configuración permite la iluminación directa de la muestra. Alternativamente, la iluminación de campo completo del canal de visualización puede comprender una fuente dispuesta aguas arriba del objetivo del microscopio y un elemento divisor del haz, por ejemplo un cubo divisor, configurado para dirigir un haz de iluminación a través del objetivo del microscopio hacia la muestra.

Según una o más realizaciones, la segunda banda espectral difiere al menos parcialmente de la primera banda espectral y dicho canal de visualización comprende medios para reducir la potencia luminosa al menos en dicha primera banda espectral. En algunos casos, un haz que ilumina la muestra en el canal de iluminación del canal de análisis microscópico puede tener una potencia luminosa lo suficientemente fuerte como para deslumbrar al detector del canal de visualización. Al reducir la potencia luminosa al menos en dicha primera banda espectral, se limita este riesgo de deslumbramiento.

Según una o más realizaciones, la segunda banda espectral difiere al menos parcialmente de la primera banda espectral y dicho elemento divisor de haz comprende una placa o cubo dicróico, configurado para separar los haces en cada una de dichas bandas espectrales primera y segunda. La placa dicróica constituye entonces un medio para reducir la potencia luminosa en dicha primera banda espectral. Según una o más realizaciones, el canal de análisis

microscópico comprende un dispositivo para escanear un haz de iluminación de la muestra y un haz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra y dicho elemento divisor de haz forma parte del dispositivo de escaneo.

5 Según una o más realizaciones, dicho elemento de imagen que indica la posición de dicho patrón de detección comprende un elemento gráfico determinado mediante calibración previa. Esta configuración es particularmente ventajosa cuando el patrón de iluminación no es detectado por el detector del canal de visualización, ya sea porque el detector del canal de visualización no es sensible en la primera banda espectral, o porque la primera banda espectral está cortada en el canal de visualización para limitar el deslumbramiento. Esta configuración también es ventajosa cuando el patrón de iluminación es difícil de identificar en la imagen de visualización, o si el patrón de detección es sustancialmente diferente del patrón de iluminación.

10 Según una o más realizaciones, dicho canal de análisis microscópico es un canal de imagen confocal y/o de imagen tomográfica de coherencia óptica y dicha información de análisis microscópico de la muestra comprende al menos una imagen de la muestra. Por ejemplo, el canal de análisis microscópico es un canal de imágenes de tomografía de coherencia óptica como se describe en el estado de la técnica y está configurado para formar *B-Scans*, *C-Scans* (o imágenes *en cara*) de la muestra o imágenes 3D de la muestra. Se sabe que una imagen transversal "*B-Scan*" de la muestra es una imagen formada en un plano paralelo al eje óptico del objetivo del microscopio; una imagen transversal "*C-Scan*" de la muestra es una imagen formada en un plano perpendicular al eje óptico del objetivo del microscopio, y una imagen 3D de la muestra resulta de la adquisición de una pluralidad de imágenes *B-Scans* o *C-Scans* y permite así analizar la muestra en un volumen.

15 Según una o más realizaciones, dicho canal de análisis microscópico es un canal de análisis espectroscópico y dicha información de análisis microscópico de la muestra comprende al menos un espectro de dicho haz de luz emitido por la muestra en al menos un punto de la muestra.

Según un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de análisis de una muestra, que comprende:

- 25 • análisis microscópico de la muestra mediante un canal de análisis microscópico que comprende un objetivo de microscopio de determinada apertura numérica nominal en un determinado campo de visión, dicho análisis microscópico comprende:
 - 30 ○ iluminar la muestra a través del objetivo del microscopio según un primer patrón de iluminación determinado y en una primera banda espectral;
 - detectar en dicho campo de visión y de acuerdo con un patrón de detección, un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra para formar una señal de detección;
 - procesar dicha señal de detección para generar información para el análisis microscópico de la muestra;
- 35 • formación de una imagen de visualización por reflexión superficial de un determinado campo de visión efectivo de la muestra que abarca dicho campo de visión, mediante un canal de visualización que comprende dicho objetivo de microscopio, un detector bidimensional, uno o más elementos de formación de imágenes configurados para formar con dicho objetivo de microscopio un dispositivo de formación de imágenes de campo completo, comprendiendo la formación de la imagen de visualización:
 - 40 ○ iluminación de campo completo de la muestra en una segunda banda espectral;
 - conjugación óptica del campo efectivo de la muestra con un área de detección del detector bidimensional, por medio de dicho dispositivo de formación de imágenes de campo completo, para formar dicha imagen de visualización;
- mostrar dicha imagen de visualización y, en dicha imagen de visualización, mostrar un elemento de imagen que indique la posición de dicho patrón de detección.

45 Según una o más realizaciones, el análisis microscópico de la muestra y la formación de una imagen de visualización se llevan a cabo de forma continua, lo que implica que las fuentes de iluminación del canal de análisis y del canal de visualización están ambas en funcionamiento cuando el sistema de análisis microscópico está en uso. Esta configuración es posible en particular en el caso en que un haz de iluminación procedente de la muestra en el canal de análisis microscópico sea invisible o muy atenuado en el canal de visualización, o más generalmente cuando el haz de iluminación procedente de la muestra en el canal de análisis microscópico no perturbe la adquisición de la imagen de visualización.

50 Según una o más realizaciones, el procedimiento de análisis de una muestra según el primer aspecto comprende:

- una primera etapa de formación de una imagen a simple vista de la muestra sin iluminar el canal de análisis microscópico,
- detección de una zona de análisis de interés en la imagen de visualización de la muestra y
- 55 • análisis microscópico de dicha muestra en dicha zona de interés.

Esta configuración es de interés en particular en el caso en que un haz que ilumina la muestra en el canal de análisis microscópico puede interferir con la detección en el canal de visualización, pero la iluminación de la muestra en el canal de visualización no interfiere con la detección en el canal de análisis microscópico.

5 También es posible apagar la iluminación del canal de visualización durante el análisis microscópico de la muestra si la iluminación de la muestra en el canal de visualización perturba la detección en el canal de análisis microscópico. En este caso, el análisis microscópico de la muestra y la formación de una imagen de visualización se realizan sucesivamente.

10 Según una o más realizaciones, el análisis microscópico de la muestra comprende imágenes confocales y/o tomográficas de coherencia óptica de la muestra para formar imágenes B-Scans, C-Scans o 3D de la muestra. Según una o más realizaciones, el procedimiento comprende además la representación de al menos una de dichas imágenes B-Scans y C-Scans, y/o en el caso de formar una imagen 3D, la representación de al menos una de dichas imágenes B-Scans y C-Scans extraídas de la imagen 3D.

15 Por ejemplo, el análisis microscópico de la muestra comprende la formación de imágenes de tipo B-Scan con una tasa de formación de imágenes dada y dicha tasa de formación de imágenes está sincronizada con una tasa de adquisición de las imágenes de visualización. Dado que la adquisición de imágenes B-Scans puede requerir que el haz de iluminación se explore profundamente en la muestra, por ejemplo mediante el desplazamiento axial del objetivo del microscopio, la sincronización garantiza que las imágenes de visualización se adquieran con el objetivo del microscopio en la misma posición relativa a la superficie de la muestra.

20 Según una o más realizaciones, el análisis microscópico de la muestra comprende un análisis espectroscópico de la muestra.

Según una o varias realizaciones, el procedimiento según el segundo aspecto comprende una etapa de calibración previa que permite determinar para dicho elemento de imagen un elemento gráfico que indica la posición de dicho patrón de detección.

25 Según una o más realizaciones, el procedimiento según el segundo aspecto comprende además mostrar un marcador superpuesto a dicho elemento de imagen de la imagen de visualización, dicho marcador permitiendo a un usuario apuntar a un punto de interés en el patrón de detección. Así, en algunas realizaciones, un usuario puede posicionar el marcador en dicho elemento de imagen para obtener información de análisis microscópico en la muestra en dicho marcador. Alternativamente, en algunas realizaciones, un usuario puede seleccionar un punto de interés en la información del análisis microscópico y ver el marcador colocado en el lugar correspondiente del elemento de imagen.

30 Así, por ejemplo, en el caso en que el análisis microscópico de la muestra comprenda la formación de imágenes B-Scans y/o C-Scans de la muestra, un usuario podrá apuntar a un punto en una de dichas imágenes mostradas simultáneamente con la imagen de visualización, por ejemplo mediante un retículo, y ver el marcador posicionado en la imagen de visualización, correspondiendo el marcador a la proyección del punto apuntado en la superficie de la muestra. El usuario también puede colocar el marcador en la imagen de visualización y ver una retícula colocada en una de dichas imágenes, en una posición correspondiente a la del marcador.

35

Según una o más realizaciones, la muestra es un tejido biológico, por ejemplo piel.

Breve descripción de las figuras

Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción, ilustrada por las siguientes figuras:

40 [Fig. 1A], diagrama que ilustra un primer ejemplo de sistema de análisis microscópico de una muestra según la presente descripción;
[Fig. 1B], diagrama que ilustra un segundo ejemplo de sistema de análisis microscópico de una muestra según la presente descripción;
[Fig. 1C], diagrama que ilustra un tercer ejemplo de sistema de análisis microscópico de una muestra según la presente descripción;

45 [Fig. 2], diagrama que ilustra, a título de ejemplo, un canal de visualización de un sistema de análisis microscópico de una muestra según la presente descripción;
[Fig. 3A], diagrama que ilustra, según un primer ejemplo, un dispositivo para la obtención de imágenes de campo completo de un canal de visualización de un sistema de análisis microscópico según la presente descripción;

50 [Fig. 3B], diagrama que ilustra, según un segundo ejemplo, un dispositivo para la obtención de imágenes de campo completo de un canal de visualización de un sistema de análisis microscópico según la presente descripción;
[Fig. 4], un diagrama que muestra diferentes ejemplos de un campo de visión, un campo efectivo y un campo de visión total del objetivo del microscopio, así como diferentes patrones de detección;

55 [Fig. 5A], esquemas que ilustran las etapas de calibración para determinar, para dicho elemento de imagen, un elemento gráfico que indica la posición de dicho patrón de detección, según un ejemplo aplicado a la imagen microscópica;

[Fig. 5B], diagramas que ilustran las etapas de calibración para determinar, para dicho elemento de imagen, un elemento gráfico que indica la posición de dicho patrón de detección, según un ejemplo aplicado al análisis espectroscópico;

[Fig. 6A], una primera imagen que ilustra, según un ejemplo, la representación de una imagen de visualización y de una imagen microscópica (B-Scan) obtenida mediante un procedimiento conforme a la presente descripción;

[Fig. 6B], una segunda imagen que ilustra, según este mismo ejemplo, la representación de una imagen de visualización y de una imagen microscópica (B-Scan) obtenida mediante un procedimiento conforme a la presente descripción;

[Fig. 7], imágenes que muestran un ejemplo de visualización de una imagen de visualización e imágenes microscópicas (B-Scan y C-Scan) obtenidas mediante un procedimiento conforme a la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada, se exponen muchos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente descripción. Sin embargo, será evidente para el experto en la materia que la presente descripción puede aplicarse sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito en detalle características bien conocidas para no complicar innecesariamente la descripción.

En las figuras, los elementos no se muestran a escala para una mejor visibilidad.

La Fig. 1A muestra un primer sistema de análisis microscópico 101 para una muestra S en el que el canal de análisis microscópico es un canal de formación de imágenes de barrido confocal (punto o línea), pudiendo ser la formación de imágenes no lineal.

El sistema de análisis microscópico 101 comprende un objetivo de microscopio 110 con una apertura numérica nominal dada ON en un campo de visión dado, un canal de análisis microscópico 140 que es un canal de formación de imágenes de barrido confocal, y un canal de visualización 150.

El canal de análisis microscópico 140 comprende en este ejemplo un canal de iluminación 120 configurado para iluminar la muestra a través del objetivo de microscopio 110 según un patrón de iluminación dado y en una primera banda espectral y un canal de detección 130 que comprende dicho objetivo de microscopio 110, estando dicho canal de detección configurado para detectar en el campo de visión y según un patrón de detección dado, un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra. El canal de análisis microscópico 140 también incluye una unidad de procesamiento 160 y un módulo de representación 170.

El canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico 140 comprende en este ejemplo una fuente de iluminación 121 y una lente o espejo cilíndrico deflector 122 (opcional). El canal de iluminación también comprende un elemento divisor 141 (cubo divisor o lámina divisora) y un elemento reflectante 142 (opcional) configurados para enviar un haz de iluminación emitido por la fuente de iluminación 121 hacia el objetivo del microscopio 110, así como un dispositivo de barrido del haz de iluminación 143 configurado para barrer el haz de iluminación en una o dos dimensiones. Un elemento separador 145 está configurado para separar el canal de visualización 150 y el canal de análisis microscópico 140. El elemento separador 145 es, por ejemplo, un cubo separador o una cuchilla separadora con una relación reflexión/transmisión de entre 10/90 y 90/10; puede ser de alrededor de 50/50. Además, una plataforma opcional 111 fijada al objetivo del microscopio 110 permite el desplazamiento axial 112 del objetivo con respecto a la muestra. La fuente de iluminación 121 puede comprender, por ejemplo, una fuente de emisión de luz colimada, monocromática y (especialmente) coherente. La óptica y/o los filtros espaciales (no mostrados) pueden hacer que la fuente sea colimada y/o coherente y/o monocromática. La longitud de onda de la fuente depende de la aplicación. Para la microscopía confocal que utiliza una reflexión del haz de iluminación sobre la muestra, y aplicada a la obtención de imágenes de la piel, una longitud de onda típica de la fuente de iluminación es de unos 800 nm. En el caso de la microscopía confocal con microscopía de fluorescencia o no lineal, la longitud de onda puede adaptarse a la longitud de excitación de fluorescencia o de emisión no lineal de la muestra. Dependiendo de la aplicación, también puede utilizarse una fuente policromática. Además, en microscopía no lineal, por ejemplo microscopía CARS o SRS, la fuente 121 puede comprender una pluralidad de fuentes de emisión distintas (especialmente coherentes, monocromáticas y colimadas), combinadas mediante un cubo o un portaobjetos.

En el caso de fluorescencia/microscopía no lineal, se utiliza ventajosamente un elemento separador dicróico 141 que refleja la longitud de onda de excitación y transmite la longitud de onda de emisión de la muestra (o viceversa).

El elemento óptico cilíndrico 122 es opcional y permite la microscopía con iluminación *de campo lineal*.

El escáner de haz de iluminación 143 puede configurarse para la exploración bidimensional para formar una imagen a partir de la exploración de un punto de iluminación. En el caso de un sistema *de campo lineal* con una lente de desviación cilíndrica o un espejo 122, el dispositivo de exploración del haz de iluminación 143 puede configurarse para la exploración unidimensional. El dispositivo de exploración puede comprender uno o más elementos de exploración seleccionados entre los siguientes: espejos galvanométricos, espejos poligonales, sistemas de desviación electro o acusto-ópticos, o una combinación de los mismos (en el caso de la exploración bidimensional). El dispositivo de

exploración también puede incluir óptica para conjugar al menos uno de dichos elementos de exploración con una pupila de entrada del objetivo 110 del microscopio con el fin, por ejemplo, de evitar el viñeteado.

El canal de detección 130 del canal de análisis microscópico 140 comprende en este ejemplo un detector 138, el objetivo de microscopio 110, el dispositivo de barrido 143 y los elementos reflectantes o parcialmente reflectantes 145, 142 (opcionales), 141 configurados para enviar un haz emitido por la muestra S en respuesta a dicha iluminación de la muestra hacia el detector 138. El canal de detección 130 también comprende en este ejemplo un objetivo 131 configurado para conjugar ópticamente, con el objetivo del microscopio, un plano de la muestra S con un área de detección del detector 138. Por supuesto, el objetivo 131 o "lente tubular" puede estar formado por varias lentes ópticas y también puede sustituirse por uno o varios elementos reflectantes, por ejemplo, un espejo esférico o parabólico.

El detector 138 comprende un sensor óptico con un área de detección, y también puede incluir filtros espaciales para la detección confocal, si las dimensiones del área de detección no lo permiten, y/o filtros espectrales para limitar la banda de longitudes de onda detectadas a la banda de emisión de la muestra en el caso de un sistema de fluorescencia/microscopía no lineal. El sensor puede comprender una zona de detección elemental (por ejemplo, un fotodiodo) en el caso de un sistema de exploración puntual, un sensor unidimensional (por ejemplo, una cámara lineal) en el caso de un sistema *de campo lineal*, o un sensor bidimensional en el que sólo se considera una región de interés para actuar como zona de detección elemental o como sensor unidimensional. Obsérvese que un sensor bidimensional también puede utilizarse de forma "convencional" si se coloca un segundo dispositivo de exploración similar al dispositivo 143 aguas arriba del sensor. La unidad de procesamiento 160 recibe, de forma conocida, una señal de detección generada por el detector 138 y reconstruye imágenes microscópicas a partir de la señal de detección, por ejemplo una imagen 2D *a partir de* una señal de detección resultante de un barrido de un patrón de iluminación puntual o lineal.

La unidad de procesamiento está conectada a un módulo de representación 170 configurado para mostrar una imagen de vista y, en la imagen de vista, un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección, como se ilustrará con más detalle más adelante. La unidad de procesamiento también puede estar conectada a una unidad de almacenamiento (no mostrada) para las imágenes y/o vídeos generados.

El sistema de análisis microscópico 101 también comprende el canal de visualización 150. Como se ilustra en la Fig. 1A, el canal de visualización 150 comprende el objetivo de microscopio 110, el elemento divisor de haz 145, un dispositivo de iluminación de campo completo 158 configurado para iluminar la muestra en una segunda banda espectral, un detector bidimensional 155 con un área de detección 156, y uno o más elementos de formación de imágenes representados en la Fig. 1A por elementos 151, 152 configurados para formar, con dicho objetivo de microscopio 110, un dispositivo de formación de imágenes de campo completo que conjuga ópticamente un campo efectivo dado de la muestra con el área de detección 156 del detector bidimensional 155. De este modo, el canal de visualización permite formar una imagen de visión en reflexión superficial del campo efectivo que, como se describirá con más detalle más adelante, abarca el campo de visión del objetivo del microscopio.

En este ejemplo, el dispositivo de iluminación de campo completo 158 comprende una pluralidad de fuentes de luz dispuestas en una periferia de una cara distal del objetivo de microscopio 110 y que permiten la iluminación directa de la muestra S. Las fuentes de luz son, por ejemplo, diodos emisores de luz que emiten a longitudes de onda entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 800 nm. Por supuesto, son posibles otros dispositivos de iluminación, como una fuente dispuesta aguas arriba del objetivo del microscopio y un elemento divisor del haz, por ejemplo un cubo divisor, configurado para dirigir un haz de iluminación a través del objetivo del microscopio hacia la muestra.

Como se ilustra en la Fig. 1A, el detector bidimensional 155 está conectado en este ejemplo a la unidad de procesamiento 160 para adquirir y mostrar la imagen de visualización en el módulo de representación 170.

En funcionamiento, el canal de visualización 150 permite así generar una imagen de visualización en reflexión superficial de la muestra con un campo superior al campo de visión del objetivo del microscopio. Además, la imagen de visualización muestra un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección, que puede ser un punto, una línea o una superficie. Esto permite a un usuario, por ejemplo un médico, localizar con precisión el campo de análisis microscópico en la imagen de amplio campo de visión.

La Fig. 1B representa un segundo ejemplo de un sistema de análisis microscópico 102 de una muestra S en el que el canal de análisis microscópico es un canal de tomografía de coherencia óptica (OCM), por ejemplo un canal OCM confocal, por ejemplo del tipo LC-OCT como se describe por ejemplo en [Ref. 4] o [Ref. 5].

Al igual que en el ejemplo anterior, el sistema de análisis microscópico 102 comprende un objetivo de microscopio 110 con una apertura numérica nominal (NA) determinada en un campo de visión determinado, el canal de análisis microscópico 140 que es un canal de microscopio tomográfico de coherencia óptica (OCM), el canal de visualización 150, una unidad de procesamiento 160 y un módulo de visualización 170.

En este ejemplo, el canal de visualización 150 puede ser similar al canal de visualización descrito con referencia a la Fig. 1A, siendo únicamente diferente el canal de análisis microscópico 140.

En el ejemplo mostrado en la Fig. 1B, el canal de análisis microscópico 140 comprende un canal de iluminación 120 configurado para iluminar la muestra a través del objetivo del microscopio 110 de acuerdo con un patrón de iluminación dado. En este ejemplo, el canal de iluminación comprende una fuente de iluminación 121, una lente cilíndrica deflectora o espejo 122 (opcional), un elemento divisor 141 (cubo divisor o lámina divisora) y un elemento reflectante 142 (opcional) configurado para enviar un haz de iluminación emitido por la fuente de iluminación 121 hacia el objetivo del microscopio 110. El canal de iluminación 120 también comprende en este ejemplo un dispositivo de barrido del haz de iluminación 143 configurado para barrer el haz de iluminación en una o dos dimensiones, un elemento separador 145 configurado para separar el canal de visualización 150 y el canal de análisis microscópico 140 y (opcionalmente) una plataforma 111 integral con el objetivo del microscopio 110 y (por ejemplo) el elemento separador 141, configurada para el desplazamiento axial 112 del objetivo con respecto a la muestra.

La fuente de iluminación 121 puede comprender, por ejemplo, una fuente de emisión de luz colimada, policromática y (especialmente) coherente. La óptica y/o los filtros espaciales (no mostrados) pueden hacer que la fuente sea colimada y/o coherente y/o con una distribución espectral específica. La longitud de onda central de la fuente depende de la aplicación, por ejemplo entre 600 nm y 1500 nm, y la anchura espectral oscila aproximadamente entre 50 nm y 250 nm. En el caso de una aplicación LC-OCT como la descrita, por ejemplo, en la Ref. 4, la fuente de iluminación 121 puede comprender, por ejemplo, y de manera no limitativa, un láser supercontinuo filtrado espectralmente por una fibra óptica para emisión alrededor de 800 nm y colimado por un espejo parabólico fuera de eje. En el caso de una aplicación a imágenes tomográficas de campo completo o FF-OCT (según la abreviatura de la expresión anglosajona "Full Field OCT"), como se describe por ejemplo en el artículo de E. Beaurepaire et al. [Ref. 11], la fuente de iluminación 121 puede elegirse para ser espacialmente no coherente y comprender medios para la iluminación de campo completo de la muestra, por ejemplo un sistema de iluminación Köhler. El elemento óptico cilíndrico 122 es opcional y permite la microscopía con iluminación según una línea (microscopía "*line-field*").

El dispositivo de barrido del haz de iluminación 143 puede configurarse para el barrido unidimensional o bidimensional de un punto o una línea para formar de manera conocida una imagen de sección transversal "*B-Scan*" de la muestra, es decir, en un plano paralelo al eje óptico del objetivo del microscopio, una imagen transversal "*C-Scan*" de la muestra, es decir, en un plano perpendicular al eje óptico del objetivo del microscopio, o una imagen 3D de la muestra resultante de la adquisición de una pluralidad de imágenes B-Scans o C-Scans. Como antes, el dispositivo de exploración puede comprender uno o más elementos de exploración seleccionados entre los siguientes: espejos galvanométricos, espejos poligonales, sistemas de deflexión electro o acusto-ópticos, o una combinación de los mismos (en el caso de la exploración bidimensional). El dispositivo de exploración también puede incluir óptica para conjugar al menos uno de dichos elementos de exploración con una pupila de entrada del objetivo 110 del microscopio con el fin, por ejemplo, de evitar el viñeteado.

El canal de detección 130 del canal de análisis microscópico está configurado para detectar un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra, según un patrón de detección dado, pero difiere del canal de detección del canal de análisis microscópico ilustrada en la Fig. 1A. En particular, el canal de detección comprende un interferómetro para aplicar la microscopía de tomografía de coherencia óptica. Más concretamente, el interferómetro comprende un brazo de objeto con objetivo de microscopio 110, dispositivo de barrido 143 y elementos reflectantes o parcialmente reflectantes 145, 142, 141 configurados para enviar un haz emitido por la muestra S en respuesta a dicha iluminación de la muestra a un detector 138. El interferómetro del canal de detección comprende también un brazo de referencia, separado en este ejemplo del brazo objeto por el cubo separador 141, y que comprende de manera conocida un objetivo de microscopio 133 (opcional), por ejemplo similar al objetivo de microscopio 110 para asegurar la compensación de dispersión, un sistema de compensación de dispersión (opcional, no mostrado en la Fig. 1B, en particular en el caso de que no haya un objetivo de microscopio 133), un espejo de referencia 135, una plataforma 134 (opcional) configurada, por ejemplo, para mover el espejo de referencia 135 cuando se requiere la modulación de la trayectoria óptica en el brazo de referencia. En este ejemplo, el canal de detección también comprende un objetivo 131 configurado para conjugar ópticamente, con el objetivo del microscopio, un plano de la muestra S con un área de detección del detector 138.

El detector 138 comprende, como en el ejemplo anterior, un sensor óptico con un área de detección, y puede incluir también filtros espaciales para la detección confocal, si las dimensiones del área de detección no lo garantizan, y/o filtros espectrales para limitar la banda de longitudes de onda detectadas. El sensor puede comprender una zona de detección elemental (por ejemplo, un fotodiodo) en el caso de un sistema de exploración puntual, un sensor unidimensional (por ejemplo, una cámara lineal) en el caso de un sistema "*line-field*", o un sensor bidimensional en el que sólo se considera una región de interés para actuar como zona de detección elemental o como sensor unidimensional. Para aplicaciones FF-OCT, se puede utilizar un sensor bidimensional de la forma convencional.

En funcionamiento, se crea una interferencia en la zona de detección del detector 138 entre la luz del brazo de referencia y la luz retrodispersada por la muestra iluminada según el patrón de iluminación, posiblemente y de manera conocida con una modulación de la diferencia de velocidad entre el brazo de referencia y el brazo objeto de la muestra, para la formación de imágenes tomográficas, en particular imágenes *en face*. La unidad de procesamiento 160 recibe, de manera conocida, señales de detección generadas por el detector 138 y resultantes de la detección de interferencias, y está configurada para reconstruir imágenes microscópicas a partir de las señales de detección, por ejemplo imágenes seccionales 2D (B-Scan o C-Scan). La unidad de procesamiento 160 está conectada a un módulo

de representación 170 configurado para mostrar la imagen de visualización y, en la imagen de visualización, un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección, como se ilustrará con más detalle más adelante. La unidad de procesamiento también puede estar conectada a una unidad de almacenamiento (no mostrada) para las imágenes y/o vídeos generados.

5 Dicho canal de análisis microscópico 140 funciona así como un canal de microscopía de tomografía de coherencia óptica conocido en la técnica. Aunque en la Fig. 1B se muestra un ejemplo particular, el experto en la materia entenderá que el sistema de análisis microscópico según la presente descripción es aplicable a cualquier montaje conocido en el estado de la técnica para microscopía de tomografía de coherencia óptica, siendo los elementos optomecánicos mostrados en la Fig. 1B adaptables en consecuencia. Según ejemplos, en el caso de un canal de análisis microscópico adaptado a la formación de imágenes transversales verticales de la muestra (B-Scan) mediante el barrido de una línea en profundidad, la formación de imágenes B-Scan puede sincronizarse con una velocidad de adquisición de las imágenes de visualización. Cuando la adquisición de imágenes B-Scans implica el barrido del haz de iluminación en profundidad dentro de la muestra moviendo el objetivo del microscopio, por ejemplo, la sincronización garantiza que las imágenes de visualización se adquieran con el objetivo del microscopio en la misma posición relativa a la superficie de la muestra.

La Fig. 1C representa un tercer ejemplo de un sistema de análisis microscópico 103 de una muestra S en el que el canal de análisis microscópico es un canal de espectroscopia, por ejemplo espectroscopia Raman.

Como en los ejemplos anteriores, el sistema de análisis microscópico 103 comprende un objetivo de microscopio 110 con una apertura numérica nominal ON dada en un campo de visión dado, el canal de análisis microscópico 140 que es un canal de espectroscopia, y el canal de visualización 150.

En este ejemplo, el canal de visualización 150 puede ser similar al canal de visualización descrito con referencia a la Fig. 1A, siendo únicamente diferente el canal de análisis microscópico 140.

El canal de análisis microscópico 140 comprende un canal de iluminación 120 que comprende en este ejemplo una fuente de iluminación 121, una lente cilíndrica deflectora o espejo 122 (opcional), un elemento separador 141 (cubo separador o cuchilla separadora) y un elemento reflectante 142 (opcional) configurado para enviar un haz de iluminación emitido por la fuente de iluminación 121 hacia el objetivo del microscopio 110. El canal de iluminación 120 también comprende en este ejemplo un dispositivo (opcional) de barrido del haz de iluminación 143 configurado para barrer el haz de iluminación en una o dos dimensiones, un elemento separador 145 configurado para separar el canal de visualización 150 y el canal de análisis microscópico 140 y (opcionalmente) una plataforma 111 integral con el objetivo del microscopio 110 y configurada para el desplazamiento axial 112 del objetivo con respecto a la muestra.

La fuente de iluminación 121 puede comprender, por ejemplo, una fuente de emisión de luz monocromática colimada (espacialmente) coherente. También puede utilizarse una fuente policromática, por ejemplo en la microespectroscopia de reflexión difusa. La óptica y/o los filtros espaciales (no mostrados) pueden hacer que la fuente sea colimada y/o coherente y/o monocromática. La longitud de onda de la fuente depende de la aplicación. En la microespectroscopia Raman, por ejemplo, aplicada a la obtención de imágenes de la piel, una longitud de onda típica de la fuente de iluminación puede estar comprendida entre aproximadamente 780 nm y aproximadamente 830 nm.

El elemento óptico cilíndrico 122 es opcional y permite la microscopía con iluminación según una línea ("*line-field*").

El canal de detección 130 del canal de análisis microscópico está configurado para detectar un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra, según un patrón de detección dado, pero difiere del canal de detección del canal de análisis microscópico ilustrada en la Fig. 1A o la Fig. 1B. En particular, el canal de detección comprende, además del objetivo de microscopio 110, el dispositivo de barrido 143 (opcional) y los elementos reflectantes o parcialmente reflectantes 145, 142, 141, un espectrómetro. En este ejemplo, el espectrómetro comprende, de manera conocida, un elemento de dispersión espectral 132, por ejemplo una rejilla, un objetivo 133 y un detector 134, que comprende un sensor con un área de detección unidimensional o bidimensional. En una configuración "*line-field*", un sensor bidimensional puede medir un espectro para cada punto del patrón de detección (medición de varios espectros en paralelo, correspondiendo cada línea del sensor 2D al espectro de un punto del patrón de detección).

La unidad de procesamiento 160 recibe, de forma conocida, señales de detección generadas por el detector 134 del espectrómetro para la reconstrucción de señales espectroscópicas en uno o más puntos de la muestra. La unidad de procesamiento 160 está conectada a un módulo de representación 170 configurado para mostrar la imagen de visualización y, en la imagen de visualización, un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección, como se ilustrará con más detalle más adelante. La unidad de procesamiento también puede estar conectada a una unidad de almacenamiento (no mostrada) para las imágenes y/o vídeos generados.

Tal canal de análisis microscópico 140 funciona por tanto como un canal de espectroscopia conocido en el estado de la técnica. Aunque en la Fig. 1C se muestra un ejemplo particular, el experto en la materia entenderá que el sistema de análisis microscópico aquí descrito puede aplicarse a cualquier montaje conocido en la técnica de la

espectroscopia, y en particular de la espectroscopia Raman, y que los elementos optomecánicos mostrados en la Fig. 1C pueden adaptarse en consecuencia.

Como antes, en funcionamiento, el canal de visualización 150 genera una imagen de visualización en reflexión superficial de la muestra S con un campo mayor que el campo de visión del objetivo del microscopio. Además, la imagen de visualización muestra un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección del canal de análisis microscópico, siendo el patrón de detección un punto, una línea o una superficie. Esto permite a un usuario, por ejemplo un médico, localizar con precisión el campo de análisis microscópico en la imagen de amplio campo de visión.

En cada uno de los ejemplos ilustrados en las Fig. 1A, 1B o 1C, el elemento separador 145 configurado para separar el canal de visualización 150 y el canal de análisis microscópico 140 se dispone para transmitir un haz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra por el dispositivo de iluminación 158 del canal de visualización hacia el detector bidimensional 155 y para reflejar un haz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra por el canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico hacia el canal de detección 140. Por supuesto, sería posible hacer funcionar el elemento divisor 145 en reflexión en el canal de visualización y en transmisión en el canal de análisis microscópico. Además, cuando el canal de análisis microscópico incluye un dispositivo de barrido (143, Fig. 1A - 1C), el elemento divisor del haz puede formar parte del dispositivo de exploración.

En cualquiera de las dos configuraciones, el elemento separador puede configurarse para limitar la potencia luminosa en el canal de visualización 150 de la luz procedente del canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico y reflejada por la muestra. La luz, procedente por ejemplo de una fuente láser, puede ser potente y deslumbrar el canal de visualización. Por lo tanto, es posible utilizar un elemento separador con un coeficiente de reflexión diferente del coeficiente de transmisión (por ejemplo, una placa de vidrio). Para reducir la potencia luminosa en el canal de visualización, también es posible añadir una densidad óptica en el canal de visualización 150 (aguas abajo del elemento separador 145).

En el caso de que la banda espectral de la fuente de iluminación 121 del canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico sea al menos parcialmente diferente de la banda espectral del dispositivo de iluminación 158 del canal de visualización, el elemento separador puede comprender también un elemento dicróico, por ejemplo una placa o cubo dicróico.

También es posible proporcionar medios para reducir la potencia luminosa en el canal de visualización, pudiendo estos medios para reducir la potencia luminosa contener un elemento de filtrado espectral cuando la banda espectral de la fuente de iluminación 121 del canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico es al menos parcialmente diferente de la banda espectral del dispositivo de iluminación 158 del canal de visualización.

También es posible no activar la iluminación de los canales de visualización y de análisis microscópico de forma continua, en el caso de que la iluminación de uno de los canales pudiera interferir con la detección en el otro canal.

Así, en la práctica, el análisis microscópico de la muestra y la formación de una imagen de visualización pueden llevarse a cabo de forma continua. Este es el caso cuando el elemento de imagen es directamente la imagen formada por el dispositivo de imagen de campo amplio del canal de visualización del patrón de iluminación del canal de análisis microscópico. Este también puede ser el caso cuando el elemento de imagen es un elemento gráfico que indica la posición del patrón de detección y la iluminación del canal de análisis microscópico no interfiere con la detección del canal de visualización, por ejemplo porque está muy atenuada en el canal de visualización, y viceversa.

En otras realizaciones, el procedimiento puede comprender una primera etapa consistente en formar una imagen de vista de la muestra con la iluminación del canal de análisis microscópico apagada, detectar un área de análisis de interés en la imagen de vista de la muestra y, a continuación, analizar microscópicamente la muestra en dicha área de interés, por ejemplo moviendo la muestra para llevar el elemento gráfico previamente calibrado para indicar el área de detección, al área de análisis de interés.

Esta configuración es útil cuando la iluminación del canal de análisis microscópico puede dificultar la detección en el canal de visualización.

En algunos casos, el canal de visualización puede funcionar continuamente, tanto para la iluminación como para la adquisición, si la iluminación del canal de visualización no interfiere con la detección del canal de análisis microscópico. Esto proporciona una imagen de visualización continua, incluso si se degrada durante el tiempo en que se activa la iluminación del canal de análisis microscópico.

En otros casos, la iluminación del canal de visualización puede apagarse durante el análisis microscópico de la muestra, por ejemplo cuando la iluminación de un canal perturba la detección del otro canal y no es posible mantener la iluminación de ambos canales simultáneamente para obtener resultados utilizables.

La Fig. 2 representa un diagrama que ilustra, según un ejemplo, un canal de visualización de un sistema para el análisis microscópico de una muestra según la presente descripción. En particular, el canal de visualización mostrado

en la Fig. 2 está configurado para funcionar con cualquiera de los sistemas mostrados como ejemplo en las Fig. 1A, 1B o 1C. En la Fig. 2, sólo se muestra la parte de detección del canal de visualización, mientras que la iluminación puede comprender, como se ilustra en las Fig. 1A a 1C, un conjunto de fuentes luminosas dispuestas en la parte distal del objetivo del microscopio, o cualquier otro dispositivo para la iluminación de campo completo de la muestra S.

Como se ilustra en la Fig. 2, el canal de visualización comprende el objetivo del microscopio 110 cuya pupila de salida se indica mediante la referencia 115 y un detector bidimensional representado en la Fig. 2 por una zona de detección 156 y un objetivo 253. En este ejemplo, el canal de visualización también comprende una lente tubular 251 y un ocular 252. Junto con el objetivo 253 y el objetivo 110 del microscopio, estos elementos de formación de imágenes forman un dispositivo 250 de formación de imágenes de campo completo configurado para conjugar ópticamente un campo efectivo dado de la muestra que abarca dicho campo de visión con el área de detección 156 del detector bidimensional.

Así, a diferencia de ciertos sistemas conocidos en el estado de la técnica y en particular [Ref. 8], que describe una microcámara integrada en el espacio objeto del objetivo del microscopio, el canal de visualización según la presente descripción, al estar desplazado fuera del espacio objeto, permite formar una imagen de visualización en reflexión superficial de un campo de la muestra, denominado campo efectivo en la presente descripción, que abarca el campo de visión del objetivo del microscopio, pudiendo tener la imagen de visualización muy buena calidad óptica sin que se vea afectado el requisito de espacio en el espacio objeto del objetivo. Las dimensiones del campo efectivo están limitadas por el dispositivo de imagen de campo completo del canal de visualización. El campo efectivo puede definirse mediante un círculo con un diámetro comprendido entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 5 mm.

Para mejorar aún más la calidad óptica de la imagen de visualización, es ventajoso que el dispositivo de formación de imágenes de campo completo tenga una apertura numérica, medida en el espacio objeto del objetivo del microscopio, que sea estrictamente menor que la apertura numérica nominal del objetivo del microscopio.

De hecho, en un canal de análisis microscópico convencional, es conocido el uso de un objetivo de microscopio con una apertura numérica (NA) elevada, por ejemplo una NA de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1,25. Esta apertura numérica está garantizada por el fabricante para un campo nominal, denominado en esta descripción campo de visión, que puede estar comprendido entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 1,5 mm.

Sin embargo, dado que el objetivo del microscopio 110 no se utiliza en el canal de visualización en condiciones nominales de uso, la resolución accesible en el canal de visualización puede diferir de la anunciada en las especificaciones del objetivo. En particular, al utilizar el objetivo del microscopio con un campo efectivo mayor que el campo de visión nominal, las aberraciones y/o el viñeteado pueden estropear la calidad de la imagen. A fin de obtener una mejor calidad de imagen para el canal de visualización, puede diseñarse un dispositivo de formación de imágenes de campo completo que tenga una apertura numérica estrictamente inferior a la apertura numérica nominal del objetivo del microscopio, por ejemplo, una apertura numérica de entre 0,05 y 0,1 aproximadamente.

Una característica original del sistema de análisis microscópico según la presente descripción es, pues, poder utilizar el mismo objetivo de microscopio en dos canales ópticos diferentes, eventualmente con aperturas numéricas diferentes: en el canal de análisis microscópico en la que el objetivo de microscopio se utiliza en condiciones nominales (alta apertura numérica, alta resolución y bajo campo de visión) y en el canal de visualización en la que el objetivo de microscopio se asocia con otros elementos ópticos para formar un dispositivo de formación de imágenes de campo completo que posiblemente tenga una apertura numérica inferior, por ejemplo en torno a 0,08, una resolución inferior y un gran campo de visión. El sistema de análisis microscópico según la presente descripción puede considerarse, por tanto, como dos microscopios que funcionan en paralelo a través de un único objetivo de microscopio.

En la práctica, la apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 del canal de visualización puede limitarse colocando un diafragma 255 en el canal de visualización, por ejemplo en un plano sustancialmente conjugado con un plano de la pupila de salida 115 del objetivo del microscopio.

Las Fig. 3A y 3B ilustran dos ejemplos de reducción de la apertura numérica del dispositivo 250 de formación de imágenes de campo completo. En estos ejemplos, no se muestra el objetivo 110 del microscopio.

La Fig. 3A muestra un diagrama que ilustra un primer ejemplo en el que el canal de visualización comprende un diafragma 255 para limitar la apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo.

La Fig. 3B muestra un diagrama que ilustra un segundo ejemplo en el que la apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 del canal de visualización está limitada por uno de los elementos ópticos del dispositivo de formación de imágenes de campo completo, en este ejemplo la lente de la cámara 253. Esta configuración es especialmente interesante porque reduce el tamaño del dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 y proporciona así un canal de visualización muy compacto. Por supuesto, la apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 del canal de visualización podría estar limitada por otro de los elementos ópticos del dispositivo de formación de imágenes de campo completo, por ejemplo, el ocular 252.

Obsérvese que no es esencial que el diafragma (255, Fig. 3A o 253, Fig. 3B) esté perfectamente conjugado con el plano pupilar del objetivo del microscopio. Sin embargo, si el plano del diafragma es sustancialmente conjugado con el plano de la pupila de salida del objetivo del microscopio (como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 2), esto garantiza que no se pierda la propiedad de telecentricidad del objetivo del microscopio y que los rayos no se viñeteen dentro del objetivo 110 del microscopio.

Además, el dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 ilustra un ejemplo del diseño del canal de visualización, pero son posibles otros ejemplos. Por ejemplo, el dispositivo de formación de imágenes de campo completo 250 en el canal de visualización puede no incluir un ocular 252, la lente de la cámara 253 de formación de imágenes a una distancia finita, o el ocular 252 puede no reflejar rayos hasta el infinito. En todos los casos, como se ha explicado anteriormente, es ventajoso reducir la apertura numérica (NA) del dispositivo 250, en el espacio objeto del objetivo del microscopio, con respecto a la NA nominal del objetivo del microscopio, ya sea mediante un diafragma añadido en el canal de visualización o mediante uno de los elementos ópticos del canal de visualización configurado para formar un diafragma. Además, el dispositivo de formación de imágenes de campo completo del canal de visualización también puede ser ajustable en enfoque. Esto hace posible formar una imagen de visualización de reflexión superficial de la muestra incluso cuando el canal de análisis microscópico está configurado para formar una imagen profunda dentro de la muestra (el caso de la formación de imágenes OCM como se muestra en la Fig. 1B por ejemplo).

Cuando el canal de análisis microscópico es un canal LC-OCT, por ejemplo, se hace que el objetivo 110 del microscopio se desplace verticalmente, es decir, a lo largo de su eje óptico. La traslación puede ser dinámica en un modo de barrido vertical de la línea de iluminación (obtención de B-Scans), es decir, en una dirección paralela al eje óptico del objetivo del microscopio, o controlada por el usuario en un modo de barrido horizontal de la línea de iluminación, es decir, en una dirección contenida en un plano perpendicular al eje óptico del objetivo del microscopio (obtención de C-Scans). En el canal visualización, sin embargo, se pretende que el objetivo del microscopio continúe tomando imágenes de la superficie de la muestra, por ejemplo la superficie de la piel, que permanece en la misma posición cuando se desplaza el objetivo del microscopio. Por lo tanto, para mantener una calidad de imagen óptima para la imagen de visualización, puede ser útil poder modificar el enfoque del dispositivo de imagen de campo amplio 250 del canal de visualización para mantener la conjugación óptica entre la superficie de la muestra S y la zona de detección 156 (Fig. 2).

Para ello, es posible prever una lente de distancia focal variable para uno de los elementos ópticos, por ejemplo el objetivo 253, o prever que este objetivo pueda desplazarse, por ejemplo mediante un motor piezoeléctrico, mientras que la zona de detección se mantiene fija. En la práctica, el ajuste del enfoque puede ser automático (autofoco), lo que limita los ajustes que debe realizar el usuario.

Sin embargo, cuando la muestra es piel, por ejemplo, no siempre hay estructuras lo suficientemente nítidas como para realizar el autoenfoque de forma efectiva. Otra posibilidad consiste entonces en calibrar el enfoque ajustable del dispositivo de formación de imágenes de campo amplio 250 del canal de visualización, a fin de asociar la posición de enfoque correcta con cada posición del objetivo del microscopio dentro de su recorrido.

La Fig. 4 ilustra varios ejemplos que muestran el campo de visión 401 del objetivo de microscopio 110, para el que el fabricante garantiza una apertura numérica nominal, el campo efectivo 402 del canal de visualización y un campo total 403 del objetivo de microscopio. El campo de visión total del objetivo del microscopio es una región de un plano focal del objetivo del microscopio que comprende todos los puntos desde los que un haz de luz puede ser recogido por el objetivo. En la práctica, el campo efectivo 402 se elige lo suficientemente grande como para obtener una imagen de amplio campo de visión, pero más pequeño que el campo total para mantener una imagen de suficiente calidad óptica.

Estos tres ejemplos muestran tres patrones de detección del canal de análisis microscópico, a saber, una línea 431, una superficie 432 y un punto 433. En todos los casos, el patrón de detección se encuentra dentro del campo de visión del objetivo del microscopio.

Un procedimiento de análisis microscópico según la presente descripción puede implementarse mediante un sistema de análisis microscópico como el descrito por ejemplo y de forma no limitativa, mediante uno de los sistemas 101, 102, 103 descritos con referencia a las Fig. 1A, 1B, 1C respectivamente.

El procedimiento comprende analizar microscópicamente la muestra S, por ejemplo tejido biológico como piel, utilizando un canal de análisis microscópico 140 como se describe por ejemplo con referencia a las Fig. 1A, 1B o 1C y formando una imagen de visualización de la muestra por medio de un canal de visualización 150 como se describe, por ejemplo, en referencia a las Fig. 1A - 1C y Fig. 2, 3A - 3B anteriores. La imagen de visión es una imagen de reflexión de un campo efectivo 402 (Fig. 4) de la muestra que comprende el campo de visión 401, como se ha explicado anteriormente.

El procedimiento de análisis microscópico según la presente descripción comprende además mostrar en la imagen de visualización de un elemento de imagen que indica la posición del patrón de detección (por ejemplo un patrón de detección 431, 432 o 433 como se ilustra en la Fig. 4). En realizaciones de ejemplo de un procedimiento según la presente descripción, el elemento de imagen puede ser directamente la imagen formada por el dispositivo de formación

de imágenes de campo amplio del canal de visualización del patrón de iluminación formado sobre la muestra por el canal de iluminación 120 del canal de análisis microscópico 140 (véanse las Fig. 1A, 1B, 1C).

Sin embargo, en algunas realizaciones, el elemento de imagen puede ser un elemento gráfico que indica la posición del patrón de detección y que se determina mediante una etapa de calibración previo.

- 5 Esta configuración es particularmente ventajosa cuando el patrón de iluminación no es detectado por el detector del canal de visualización, ya sea, por ejemplo, porque el detector del canal de visualización no es sensible en la banda espectral de la fuente de iluminación del canal de análisis microscópico, o porque la primera banda espectral en el canal de visualización está cortada para limitar el deslumbramiento. Esta configuración también es ventajosa cuando el patrón de iluminación es difícil de identificar en la imagen de visualización, o si el patrón de detección es sustancialmente diferente del patrón de iluminación. La Fig. 5A muestra así diagramas que ilustran, según un primer ejemplo aplicado a la formación de imágenes microscópicas, etapas de calibración para determinar, para dicho elemento de imagen, un elemento gráfico que indica la posición del patrón de detección del canal de formación de imágenes microscópicas, en este ejemplo un patrón de detección formado por una superficie rectangular. El procedimiento de calibración se realiza con una muestra de calibración que tiene un borde afilado, por ejemplo el borde de un portaobjetos de vidrio cortado "en ángulo recto", o el borde de un patrón impreso fotolitográficamente en un portaobjetos de vidrio. En una primera etapa 501, se adquieren una imagen de visualización 510 de la muestra de calibración y una imagen microscópica 520 *orientada hacia ella*, de modo que un borde afilado de la muestra visible en la imagen de visualización sea visible en un borde de la imagen microscópica 520, en este ejemplo un borde recto. La línea 531 de la imagen de visualización se registra entonces como el borde derecho del área de detección del canal de análisis microscópico. El procedimiento se repite en una segunda etapa 502 moviendo la muestra de modo que esta vez el borde afilado de la muestra se encuentre en un lado diferente de la imagen microscópica, en este ejemplo el borde izquierdo. Del mismo modo, la imagen 532 de la imagen de visualización se registra como el borde izquierdo del área de detección del canal de análisis microscópico. El procedimiento se repite en las etapas 503, 504 de la misma manera, cada vez moviendo la muestra para que el borde afilado aparezca en un nuevo lado de la imagen microscópica 520. En cada caso, se registra una línea correspondiente 534, 535 en la imagen de visualización. Como se ilustra en el diagrama 505, a partir de las 4 líneas registradas en la imagen de vista, puede reconstruirse un elemento gráfico que indica la posición del patrón de detección, en este ejemplo una superficie rectangular que puede materializarse mediante un rectángulo en la imagen de vista cuando se adquiere una imagen microscópica. Por lo tanto, la calibración permite identificar perfectamente el patrón de detección del canal de análisis microscópico en el canal de visualización, independientemente de la muestra que se esté analizando. La calibración puede adaptarse a un patrón de detección de líneas o puntos.

La Fig. 5B muestra diagramas que ilustran, según un segundo ejemplo aplicado al análisis espectroscópico, por ejemplo al análisis espectroscópico Raman, etapas de calibración para determinar, para dicho elemento de imagen, un elemento gráfico que indica la posición del patrón de detección, en este ejemplo un punto de detección.

- 35 En una primera etapa 541, se adquiere una imagen de visualización 510 de la muestra de calibración y se mide al mismo tiempo una señal Raman (561). La muestra de referencia se mueve de izquierda a derecha, por ejemplo, hasta que se observa una señal Raman intensa (562). Esto corresponde al primer borde afilado de la muestra de calibración 551 que se registra. El procedimiento se repite en una segunda etapa 542 moviendo la muestra de calibración, por ejemplo de abajo hacia arriba, hasta que aparezca de nuevo una señal Raman fuerte (espectro 562). Esto corresponde a un segundo borde afilado de la muestra de calibración 552 que se registra. Como se ilustra en la etapa 543, a partir de las dos líneas registradas 551, 552, se puede determinar un elemento gráfico representativo del patrón de detección 530 (aquí un disco centrado en el punto de detección), y posicionado en la intersección de las dos líneas. La precisión de la calibración puede comprobarse repitiendo las etapas 541 y 542, pero moviéndose, por ejemplo, de derecha a izquierda y luego de arriba abajo. Por lo tanto, la calibración permite identificar perfectamente el patrón de detección del canal de análisis microscópico en el canal de visualización, independientemente de la muestra que se esté analizando.

En la práctica, un procedimiento para el análisis microscópico de una muestra, por ejemplo el análisis de la piel de un paciente, puede ser llevado a cabo de la siguiente manera por un profesional, por ejemplo un dermatólogo, implementando las etapas de un procedimiento según la presente descripción.

- 50 En una primera etapa, se lleva a cabo un examen visual de la piel. Se pueden tomar imágenes clínicas (fotografías) para localizar estructuras "sospechosas" en todo el cuerpo. A continuación se realiza un examen dermatoscópico. El dermatólogo toma imágenes de la estructura sospechosa con un sistema óptico de aumento, como un dermatoscopio, que corresponde ópticamente a una lupa, digital o no, con iluminación integrada. El campo de visión del dermatoscopio suele ser de 1 a 3 cm. Las imágenes dermatoscópicas pueden grabarse directamente con un dermatoscopio digital o utilizando una cámara.

Si queda alguna duda durante el examen dermatoscópico, el dermatólogo procede al análisis microscópico de la piel, por ejemplo utilizando un sistema como el ilustrado en la Fig. 1B, por ejemplo con un canal de análisis microscópico del tipo LC-OCT. El dermatólogo coloca el cabezal de la sonda manual (es decir, la parte del sistema en contacto con la piel para obtener imágenes) lo más cerca posible de la estructura sospechosa. A continuación, desplaza toda la

sonda (sin dejar de estar en contacto con la piel) hasta que haya localizado con precisión la lesión previamente identificada por dermatoscopia, utilizando el canal de visualización como guía.

Una vez identificada la estructura en la imagen de visualización, el dermatólogo procede a analizar la piel a nivel celular y en profundidad utilizando el canal de análisis microscópico LC-OCT.

5 El examen comienza, por ejemplo, con el modo de imagen de sección vertical (B-Scan), que da acceso directo a toda la profundidad de la estructura. Gracias al elemento de imagen que aparece en la macroimagen y que indica la posición del patrón de detección (una línea en el caso del modo de imagen transversal), el profesional sabe perfectamente a qué nivel de la estructura está observando una sección vertical a escala celular.

10 El dermatólogo también puede estar interesado en la imagen LC-OCT para buscar marcadores patológicos a nivel celular/en profundidad en la piel, con el fin de enriquecer la información ya obtenida por dermatoscopia. En esta fase, podemos desplazarnos por la estructura para buscar estos marcadores patológicos o estudiarlos.

15 Esto puede hacerse de dos maneras. Lateralmente mediante el dispositivo de exploración (143, Fig. 1B) presente en el dispositivo, que permite explorar el patrón de detección. La amplitud de esta exploración es bastante pequeña ($\sim 500 \mu\text{m}$), y en una sola dirección. La segunda forma consiste en mover toda la sonda o la piel bajo la sonda. Este desplazamiento será menos fino (su precisión dependerá del control del usuario), pero el dermatólogo dispondrá de tanta amplitud como desee para enfocar cualquier zona en LC-OCT. Para este tipo de desplazamiento, la imagen de visualización es importante porque permite al dermatólogo asegurarse de que siempre se mantiene nivelado con la estructura al mover la sonda o la piel.

20 Una vez identificados los marcadores mediante LC-OCT, son posibles varias opciones. El dermatólogo puede cambiar al modo de sección horizontal (C-Scan o *en face*) para mejorar su comprensión de la estructura (con el mismo enfoque para navegar por la estructura que en el modo de sección vertical).

25 También es posible adquirir información en un volumen de la muestra para estudiar marcadores patológicos en 3D sobre un área de interés. Una vez adquiridos uno o varios volúmenes, el dermatólogo puede detener el sistema de adquisición y estudiar los volúmenes adquiridos para su análisis. Obsérvese que la grabación de un volumen va acompañada de la grabación de un determinado número de imágenes de destino adquiridas durante la adquisición 3D (del mismo modo, la grabación de cualquier imagen/vídeo va acompañada de la grabación de la imagen/vídeo de destino asociada). Durante una adquisición 3D se graban varias imágenes de visualización en caso de que el profesional se haya movido durante la adquisición (las adquisiciones 3D pueden ser relativamente largas).

30 Las Fig. 6A, 6B y 7 representan imágenes que ilustran ejemplos de imágenes visuales e imágenes microscópicas B-Scans y C-Scans registradas durante una adquisición de un volumen mediante un procedimiento conforme a la presente descripción.

35 En estos ejemplos, el canal de análisis microscópico es un canal de análisis de tipo LC-OCT, como se muestra por ejemplo en la Fig. 1B, configurado para la adquisición de imágenes 3D. Para obtener estas imágenes, la fuente utilizada (121, Fig. 1B) es un láser supercontinuo filtrado por una fibra óptica para una emisión en torno a 800 nm y colimado por un espejo parabólico fuera de eje. El objetivo del microscopio 110 es un objetivo de inmersión en aceite de silicona con un aumento de $20\times$ y una apertura numérica $\text{ON} = 0,5$. Una lente cilíndrica 122 con una longitud focal de 50 mm proporciona iluminación a lo largo de una línea que mide $\sim 1,5 \text{ mm} \times 1,5 \mu\text{m}$ a nivel de la piel, con una potencia de $\sim 10 \text{ mW}$. Se utiliza un escáner galvanométrico (143, Fig. 1B) para escanear la línea de iluminación de lado a lado. El espejo deflector 142 está montado sobre un actuador piezoeléctrico para modular la interferencia y generar C-scans. En el brazo de referencia se utiliza un objetivo de microscopio 133 idéntico al objetivo 110 para compensar la dispersión. La superficie de referencia 135 del interferómetro es una interfaz aire/vidrio de una placa de vidrio de sílice fundida. La lente tubular 131 tiene una longitud focal de 150 mm y el detector 138 está formado por una cámara CMOS de barrido lineal. En el dispositivo de exploración 143 se monta una hoja divisora 90:10 (145) para separar los canales microscópico y de visualización. El canal de visualización 150 comprende una cámara 155 equipada con una óptica en miniatura de unos pocos mm , que actúa como un diafragma, tal como se describe en la figura 3B. La cámara está equipada con ajuste de enfoque/autoenfoco.

40 Las Fig. 6A y 6B ilustran, a modo de ejemplo, una imagen B-Scan 620 visualizada con una imagen de visualización 610. En la imagen de visualización 610, el elemento gráfico 630 indica la posición del patrón de detección (línea) del canal de análisis microscópico. El elemento gráfico se determina mediante calibración previa, como se describe, por ejemplo, con referencia a la Fig. 5A.

45 Puede superponerse además un marcador 640 en la imagen de vista 610 para marcar un punto en el elemento gráfico, o más generalmente en el elemento de imagen, para permitir a un usuario apuntar a un punto en la imagen B-scan 620 y visualizar la posición del punto así apuntado en la superficie de la muestra en la imagen de vista. Por ejemplo, el punto de visualización en la imagen 620 se indica mediante una retícula 641. El marcador se calibra para situarse en el nivel correspondiente a la posición del punto apuntado mediante la retícula, proyectada sobre la superficie de la muestra. Del mismo modo, es posible permitir al usuario apuntar a un punto de la imagen de visualización, dentro del

patrón de detección, directamente mediante el marcador 640, para visualizar qué posición corresponde a un punto del patrón de detección dentro de la imagen B-scan (marcado en este caso por el eje vertical del retículo).

La Fig. 6B muestra la misma imagen con el marcador 640 y la retícula 641 movidos, pudiendo el usuario mover la retícula 641 para ver el marcador reposicionado en la imagen de visualización 610, o mover el marcador 640 para ver la retícula reposicionada en la imagen B-Scan 620.

La Fig. 7 ilustra 2 imágenes extraídas de un volumen, a saber, una imagen B-Scan 721 y una imagen C-Scan 722. La imagen de visualización 710 se muestra al mismo tiempo que un patrón de detección 730 correspondiente a una superficie de detección del C-Scan.

Como en el caso de la imagen B-scan (Fig. 6A y FIG. 6B), puede superponerse un marcador 740 en el elemento gráfico de la imagen de visualización, o más generalmente en el elemento de la imagen. El marcador está calibrado para poder asociar un punto del volumen, marcado aquí por una retícula 741, con un punto del patrón de detección marcado por el marcador, en la superficie de la muestra. El usuario puede entonces apuntar a un punto mediante el marcador 740, o mediante la retícula 741, para visualizar qué posición corresponde a un punto del volumen proyectado sobre la superficie de la muestra, dentro del patrón de detección, o qué posición corresponde a un punto del patrón de detección dentro del volumen, marcado en este caso por los ejes de la retícula que pueden visualizarse en los C-scan extraídos del volumen.

Como se ilustra en estas imágenes, el procedimiento según la presente descripción permite al profesional localizar con precisión el campo de análisis microscópico (en este ejemplo B-Scans y C-Scans) en la imagen de visualización que tiene una calidad de imagen cercana a la calidad de una imagen dermatoscópica.

Aunque se describe mediante un cierto número de realizaciones, el procedimiento y sistema de análisis microscópico según la presente descripción comprende diversas variantes, modificaciones y mejoras que serán evidentes para el experto en la materia, entendiéndose que estas diversas variantes, modificaciones y mejoras forman parte del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones siguientes.

Referencias

- Ref. 1: M. Raj adhyaksha et al, "Microscopía láser de barrido confocal in vivo de la piel humana II: Advances in instrumentation and comparison with histology", J Invest Dermatol, 1999.
- Ref. 2: K. König et al, "High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution," J. Biomed. Opt. 8, 432-439 (2003).
- Ref. 3: Schmitt et al, "Subsurface Imaging of Living Skin with Optical Coherence Microscopy", Dermatology 1995;191:93-98.
- Ref. 4: Solicitud de patente publicada WO2015092019.
- Ref 5: Y. Chen et al. "Microscopía de coherencia óptica de barrido lineal de alta resolución", Optics Letters, Vol. 32, N°14, 1971 - 1973 (2007).
- Ref. 6: J. Schleusener et al, "Raman spectroscopy for the discrimination of cancerous and normal skin", Photon Lasers Med (2015).
- Ref. 7: E. Drakaki et al. "Procedimientos espectroscópicos para el fotodiagnóstico del cáncer de piel no melanoma", Journal of Biomedical Optics 18(6), 061221 (junio de 2013).
- Ref 8: Solicitud de patente publicada WO2017139712.
- Ref. 9: Patente concedida US7864996.
- Ref. 10: Z. Wu et al. "Precise in vivo tissue micro-Raman spectroscopy with simultaneous reflectance confocal microscopy monitoring using a single laser", Vol. 44, n° 6 / 15 de marzo de 2019 / Optics Letters.
- Ref. 11: E. Beaufrepaire et al. "Microscopía de coherencia óptica de campo completo" Opt. Lett. 23, 244-246 (1998)

REIVINDICACIONES

1. Sistema de análisis microscópico (101 - 103) de una muestra (S) que comprende:

- un canal de análisis microscópico (140) que comprende:

- un objetivo de microscopio (110) con una determinada apertura numérica nominal (ON) en un determinado campo de visión (401);
- un canal de iluminación (120) configurado para iluminar la muestra a través del objetivo del microscopio según un primer patrón de iluminación y en una primera banda espectral;
- un canal de detección (130) que comprende dicho objetivo de microscopio, estando dicho canal de detección configurado para detectar en dicho campo de visión y según un patrón de detección (431 - 433), un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra y generar una señal de detección;
- una unidad de procesamiento (160) configurada para generar información de análisis microscópico de la muestra a partir de dicha señal de detección;

- un canal de visualización (150) que comprende:

- dicho objetivo de microscopio (110);
- un dispositivo de iluminación de campo completo (158) configurado para iluminar la muestra en una segunda banda espectral;
- un detector bidimensional (155);
- uno o más elementos de formación de imágenes (251 - 253) que forman, con dicho objetivo de microscopio (110), un dispositivo de formación de imágenes de campo completo (250) configurado para conjugar ópticamente un campo efectivo dado de la muestra que abarca dicho campo de visión con una zona de detección (156) del detector bidimensional (155), y para formar una imagen de visión de reflexión superficial de dicho campo efectivo;

- un elemento divisor de haz (145) dispuesto aguas arriba del objetivo del microscopio para separar el canal de análisis y el canal de visualización;
- un módulo de representación (170) configurado para representar dicha imagen de visualización y, en dicha imagen de visualización, un elemento de imagen (530) que indica la posición de dicho patrón de detección.

2. Sistema de análisis de una muestra según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de formación de imágenes de campo completo tiene, en el espacio objeto del objetivo del microscopio, una apertura numérica estrictamente menor que la apertura numérica nominal del objetivo del microscopio.

3. Sistema de análisis de una muestra según la reivindicación 2, en el que dicho canal de visualización comprende además un diafragma (255) para limitar dicha apertura numérica del dispositivo de formación de imágenes de campo completo.

4. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo de formación de imágenes de campo completo de dicho canal de visualización es de enfoque ajustable.

5. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo de iluminación de campo completo del canal de visualización comprende una pluralidad de fuentes de luz (158) dispuestas en una periferia de una cara distal del objetivo del microscopio.

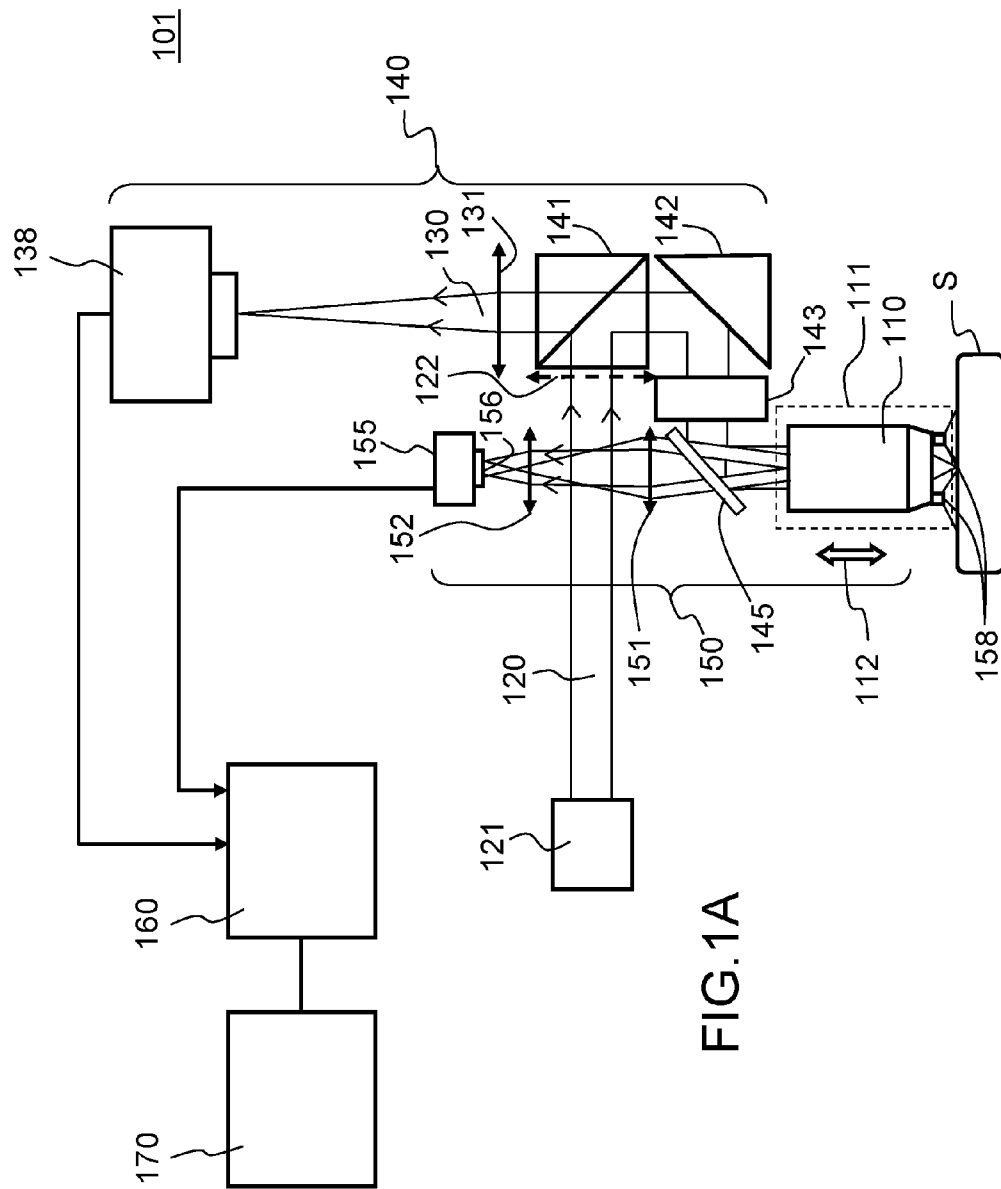
6. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha segunda banda espectral difiere al menos parcialmente de dicha primera banda espectral y dicho canal de visualización comprende medios para reducir la potencia luminosa al menos en dicha primera banda espectral.

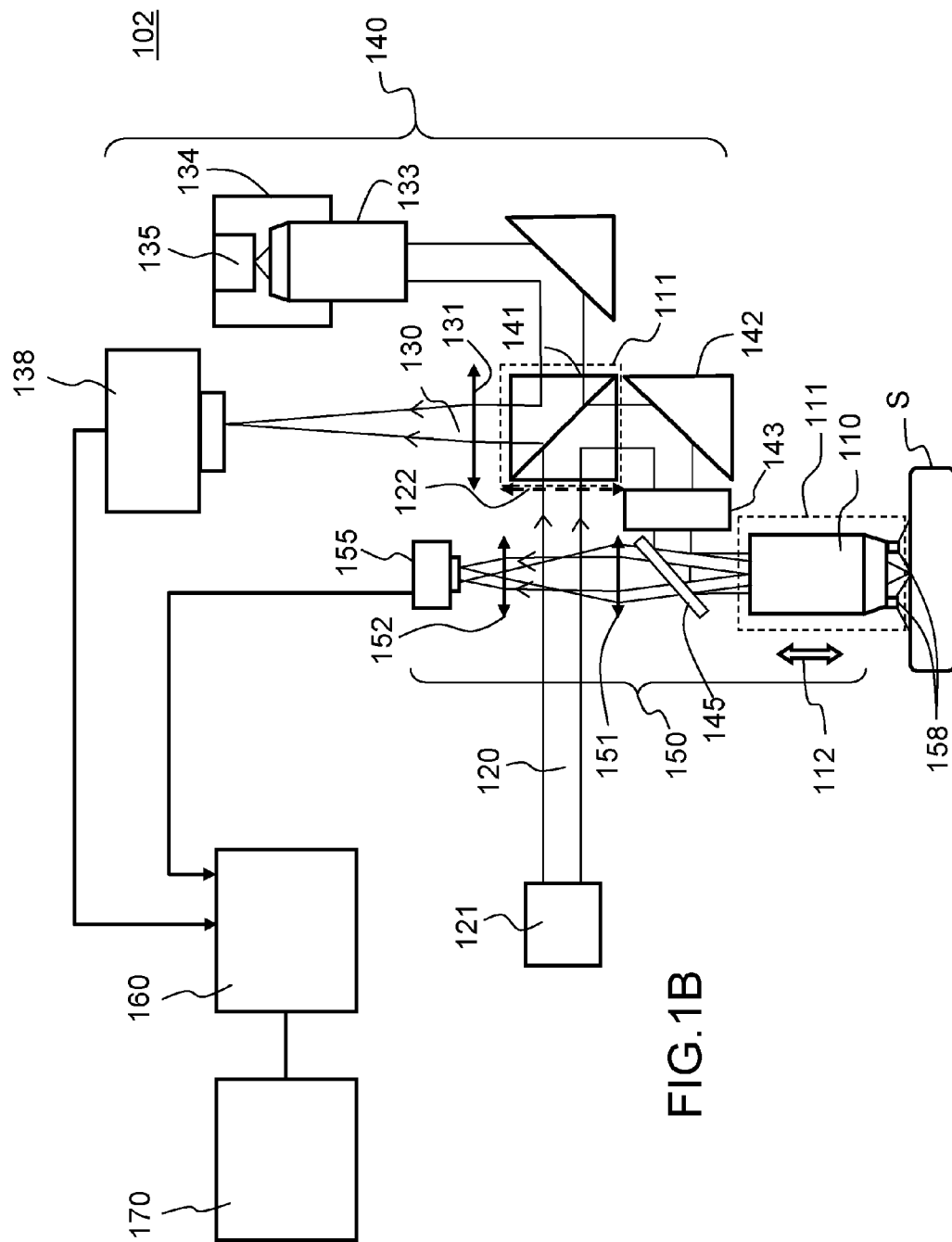
7. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha segunda banda espectral difiere al menos parcialmente de dicha primera banda espectral y dicho elemento divisor de haces comprende un elemento dicróico configurado para separar haces en cada una de dichas bandas espectrales primera y segunda.

8. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho elemento de imagen que indica la posición de dicho patrón de detección comprende un elemento gráfico determinado mediante calibración previa.

9. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho canal de análisis microscópico es un canal de formación de imágenes confocales y/o de formación de imágenes tomográficas de coherencia óptica y dicha información de análisis microscópico de la muestra comprende al menos una imagen de la muestra.

10. Sistema de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho canal de análisis microscópico es un canal de análisis espectroscópico y dicha información de análisis microscópico de la muestra comprende al menos un espectro de dicho haz de luz emitido por la muestra en al menos un punto de la muestra.
- 5 11. Procedimiento de análisis de una muestra (S), que comprende:
- un análisis microscópico de la muestra mediante un canal de análisis microscópico que comprende un objetivo de microscopio (110) con una determinada apertura numérica nominal (ON) en un determinado campo de visión (401), comprendiendo dicho análisis microscópico:
- 10
- iluminar la muestra a través del objetivo del microscopio según un primer patrón de iluminación dado (431 - 433) y en una primera banda espectral;
 - detectar en dicho campo de visión y de acuerdo con un patrón de detección, un haz de luz emitido por la muestra en respuesta a dicha iluminación de la muestra para formar una señal de detección;
 - procesar dicha señal de detección para generar información de análisis microscópico de la muestra;
- 15
- la formación de una imagen de visualización por reflexión superficial de un determinado campo efectivo de la muestra que abarca dicho campo de visión, mediante un canal de visualización (150) que comprende dicho objetivo de microscopio, un detector bidimensional (155), uno o más elementos de formación de imágenes configurados para formar con dicho objetivo de microscopio un dispositivo de formación de imágenes de campo completo (250), comprendiendo la formación de la imagen de visualización:
- 20
- la iluminación de campo completo de la muestra en una segunda banda espectral;
 - la conjugación óptica del campo efectivo de la muestra con una zona de detección (156) del detector bidimensional (155), mediante dicho dispositivo de formación de imágenes de campo completo, para formar dicha imagen de visualización;
 - la representación de dicha imagen de visualización y, en dicha imagen de visualización, mostrar un elemento de imagen (530) que indique la posición de dicho patrón de detección.
- 25 12. Procedimiento de análisis de una muestra según la reivindicación 11, en el que el análisis microscópico de la muestra y la formación de una imagen de visualización se llevan a cabo de forma continua.
13. Procedimiento de análisis de una muestra según la reivindicación 11, que comprende:
- una primera etapa de formación de una imagen de visualización de la muestra sin iluminar el canal de análisis microscópico,
- 30
- la detección de una zona de análisis de interés en la imagen de visualización de la muestra y
 - el análisis microscópico de dicha muestra en dicha zona de interés.
14. Procedimiento de análisis de una muestra según la reivindicación 13, en el que la iluminación del canal de visualización se apaga durante el análisis microscópico de la muestra.
- 35 15. Procedimiento de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el análisis microscópico de la muestra comprende la obtención de imágenes confocales y/o tomográficas de coherencia óptica de la muestra.
16. Procedimiento de análisis de una muestra según la reivindicación 15, en el que el análisis microscópico de la muestra comprende la obtención de imágenes tipo B-Scan a una velocidad de obtención de imágenes determinada y dicha velocidad de obtención de imágenes está sincronizada con una velocidad de adquisición de imágenes de visualización.
- 40 17. Procedimiento de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el análisis microscópico de la muestra comprende un análisis espectroscópico de la muestra.
18. Procedimiento de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, que comprende una etapa previa de calibración que permite determinar, para dicho elemento de imagen, un elemento gráfico que indica la posición de dicho patrón de detección.
- 45 19. Un procedimiento de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, que comprende además la representación de un marcador (640, 740) superpuesto a dicho elemento de imagen de la imagen de visualización, permitiendo dicho marcador a un usuario apuntar a un punto de interés en el patrón de detección.
- 50 20. Procedimiento de análisis de una muestra según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en el que la muestra es tejido biológico, por ejemplo piel.





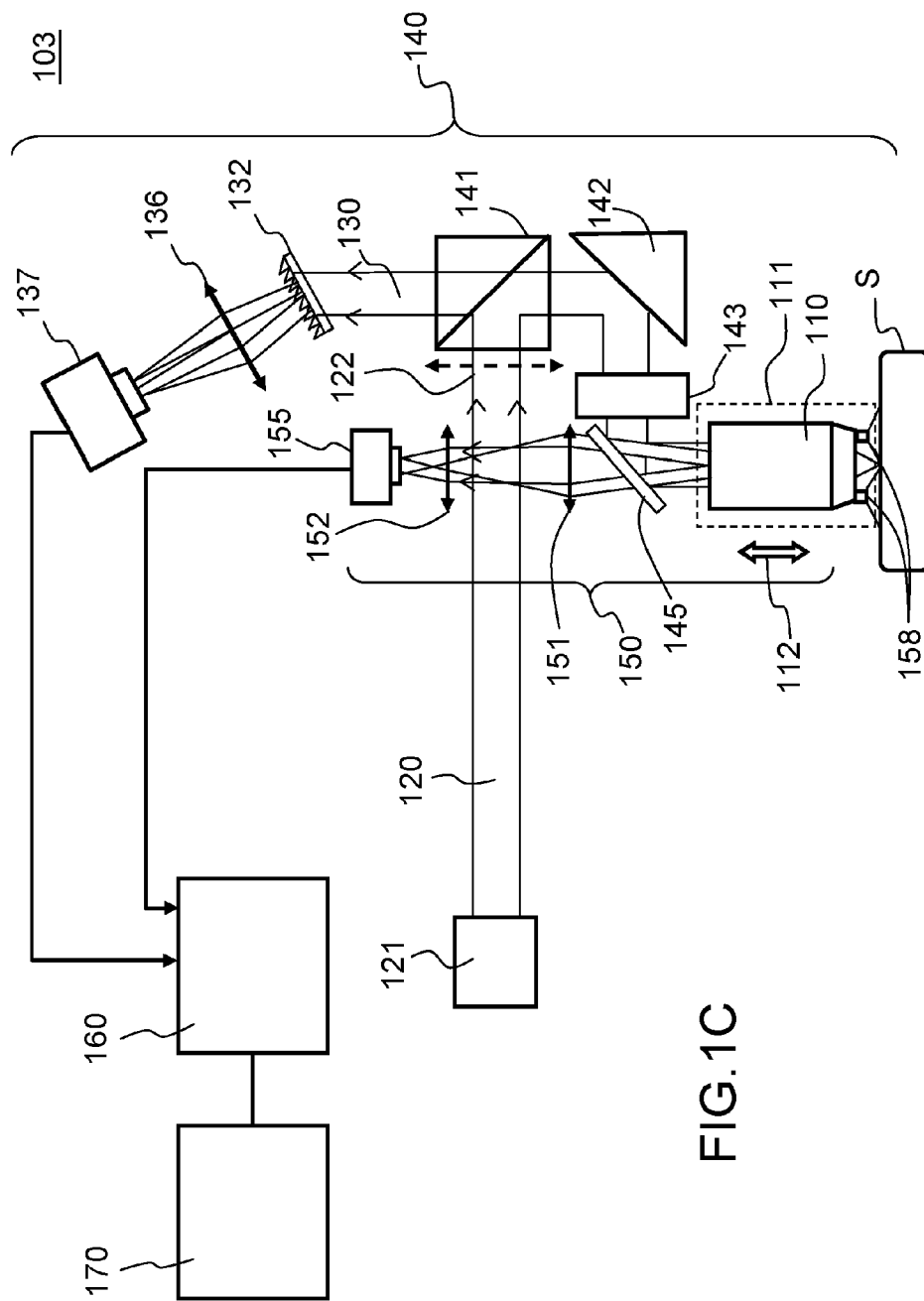


FIG. 1C

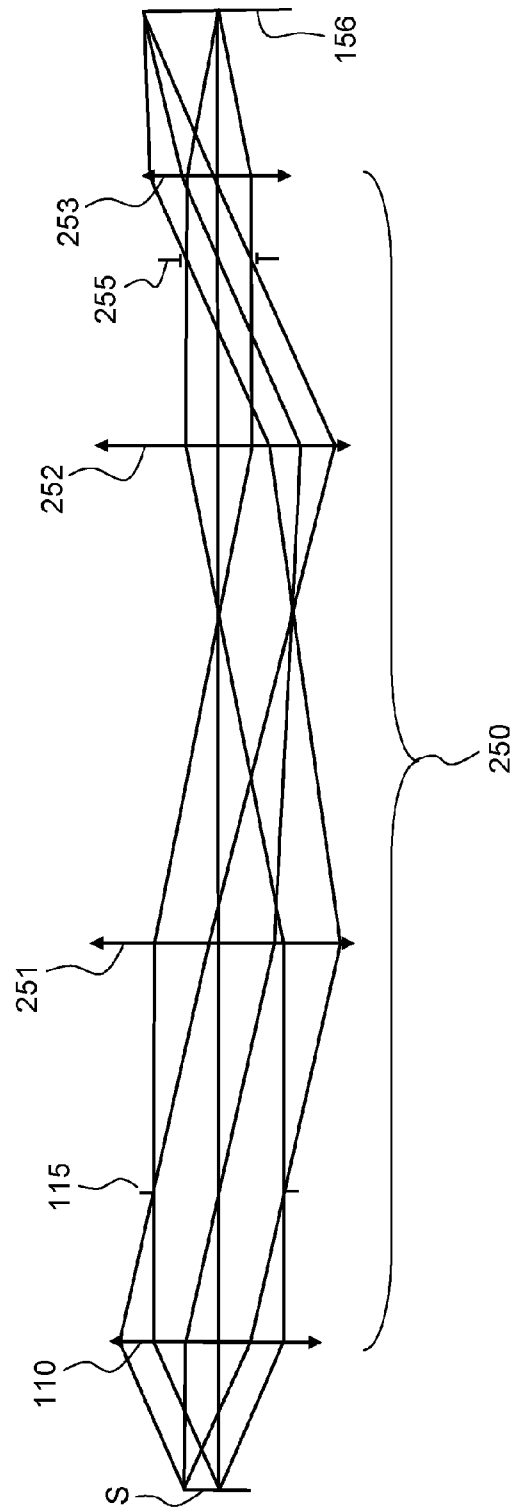


FIG. 2

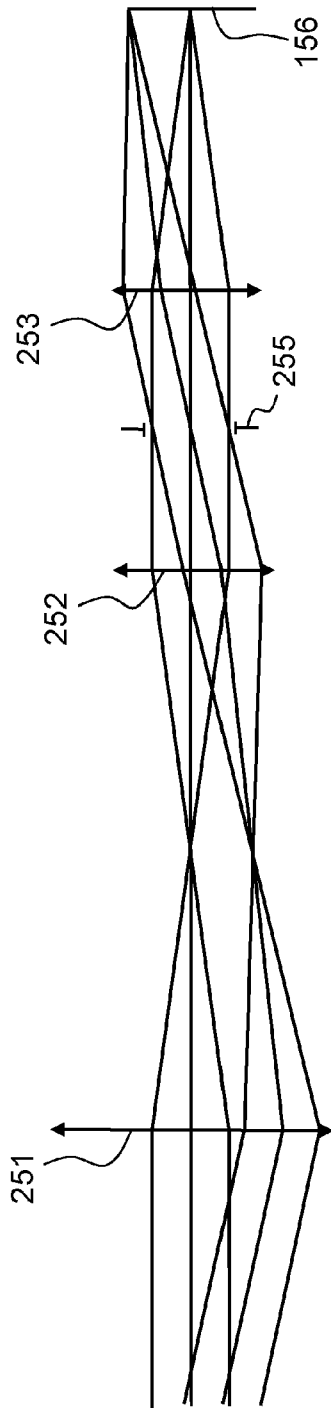


FIG. 3A

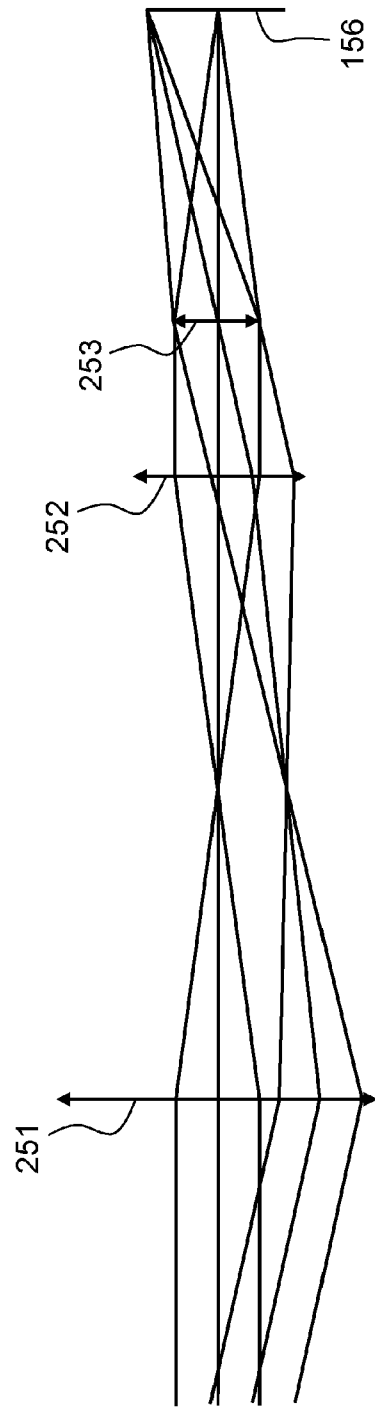


FIG. 3B

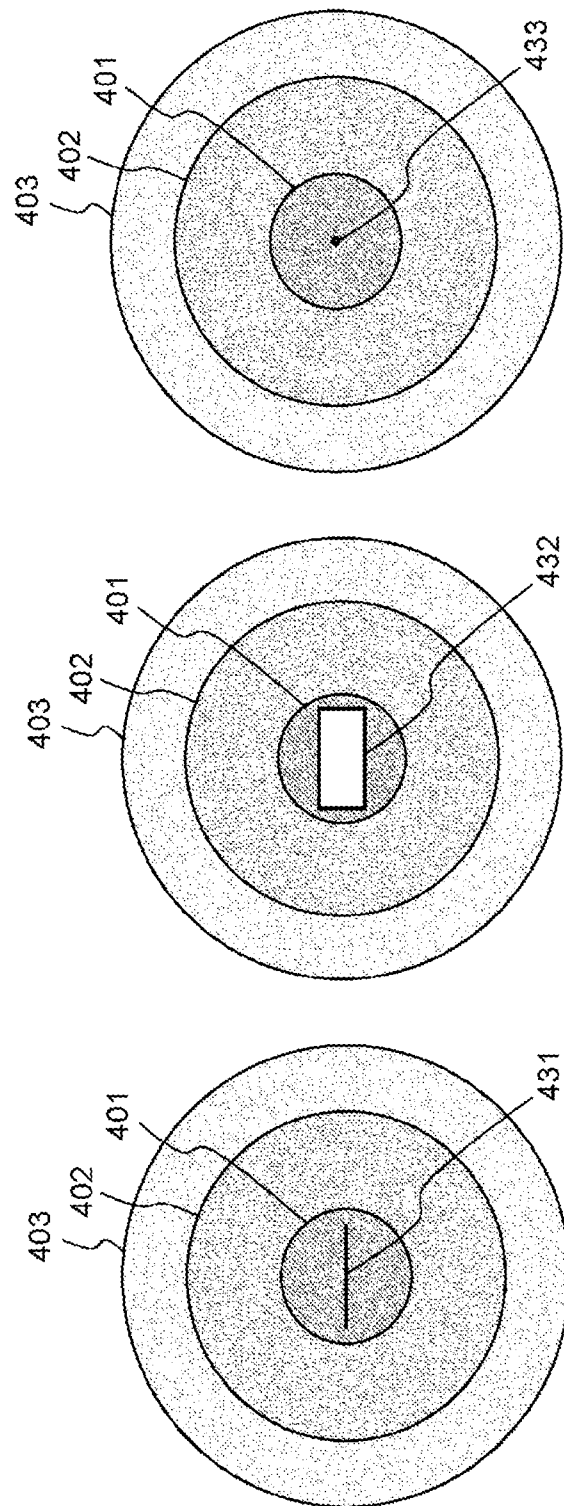


FIG.4

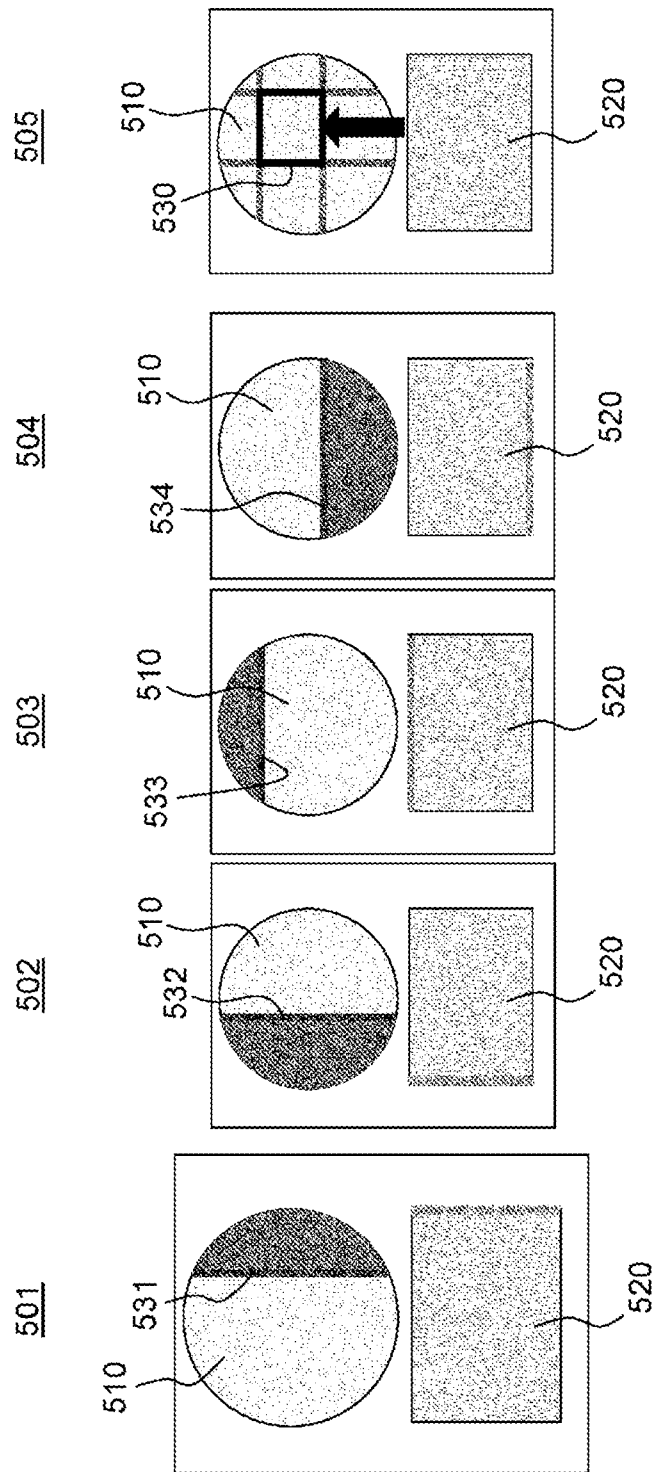


FIG. 5A

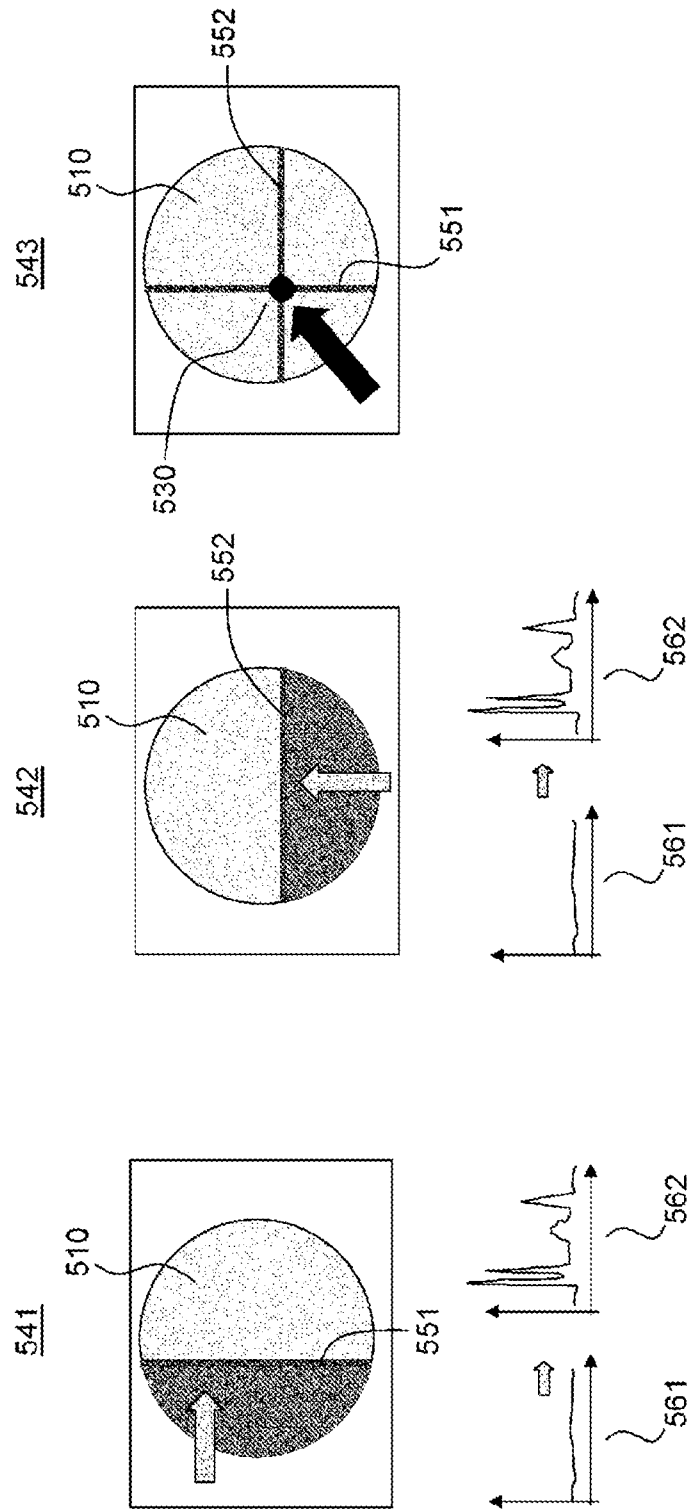


FIG. 5B

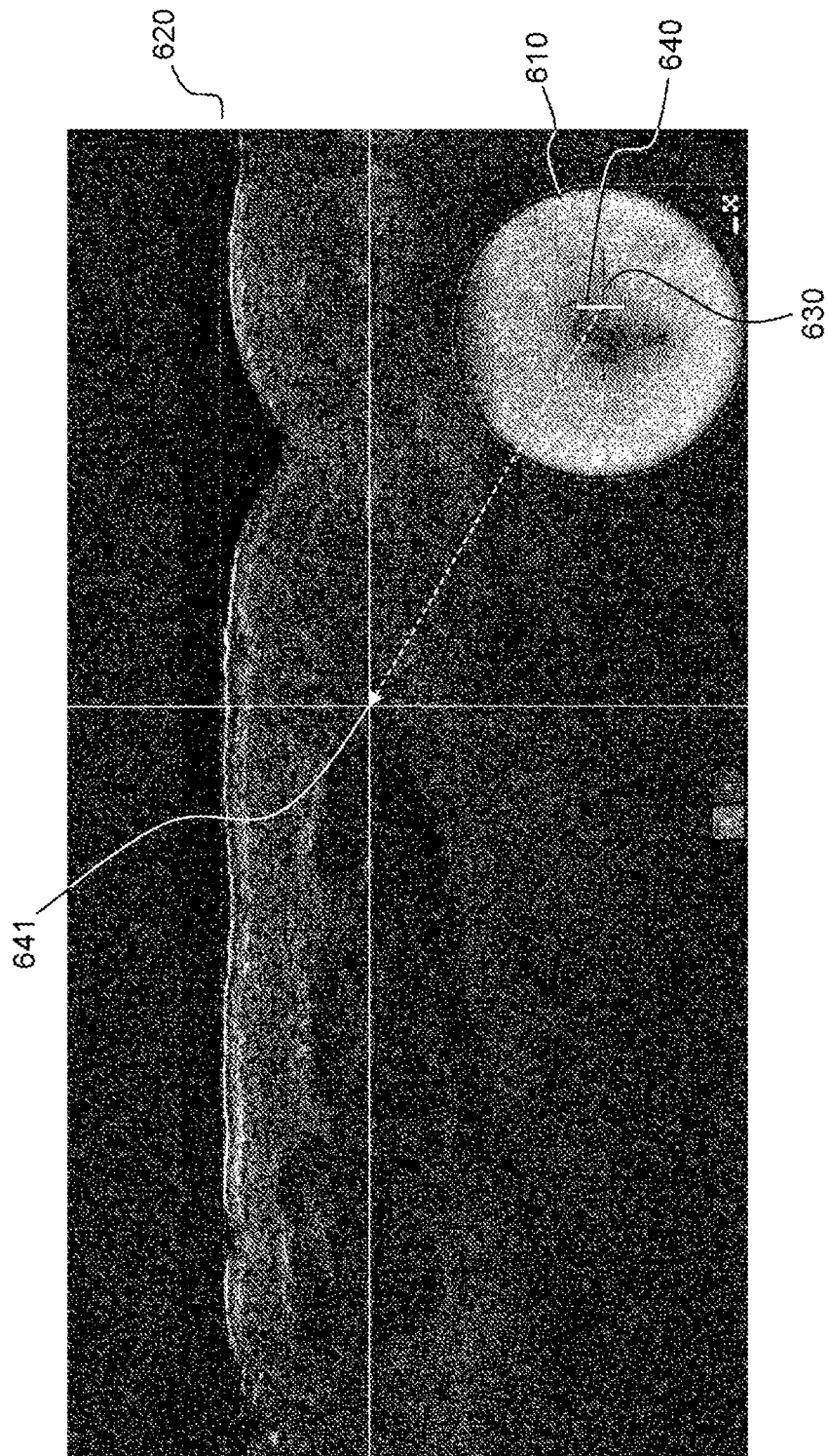


FIG. 6A



FIG.6B

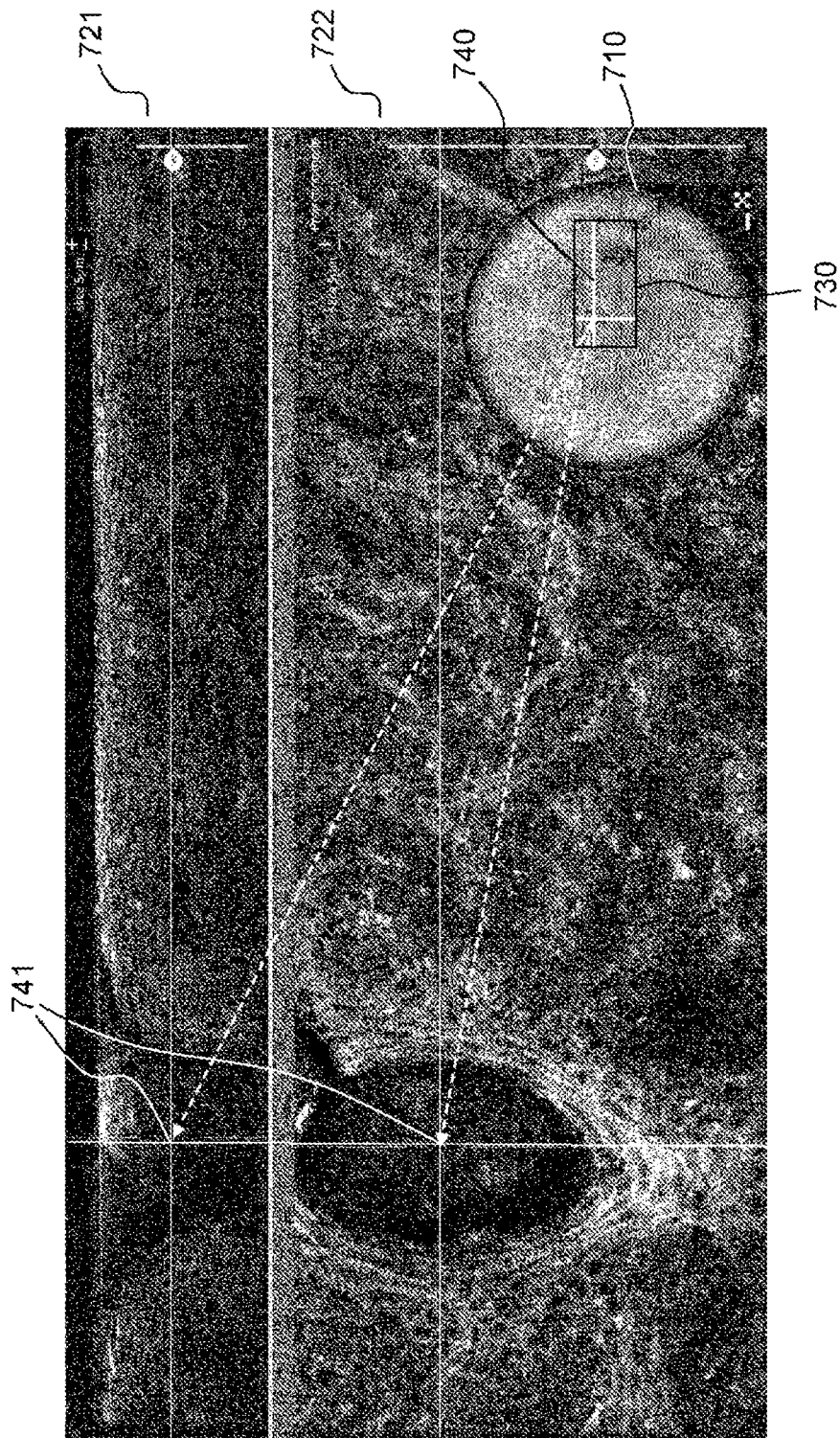


FIG. 7