

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 610**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 21/24 (2006.01)

G02B 21/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2017 PCT/EP2017/066135**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2018 WO18002224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2017 E 17734077 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3479157**

54 Título: **Medición y corrección de la inclinación del cubreobjetos en el haz luminoso de un microscopio**

30 Prioridad:

01.07.2016 DE 102016212019

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

09.05.2022

73 Titular/es:

**CARL ZEISS MICROSCOPY GMBH (100.0%)
Carl-Zeiss-Promenade 10
07745 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**SIEBENMORGEN, JÖRG y
KALKBRENNER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 909 610 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

Medición y corrección de la inclinación del cubreobjetos en el haz luminoso de un microscopio

5 Una de las principales aplicaciones de la microscopía de lámina de luz es la obtención de imágenes de muestras de tamaño medio, por ejemplo, de organismos, con un tamaño de entre unos 100 μm y unos pocos milímetros. Por regla general, estas muestras se insertan en agarosa y se disponen en un capilar de vidrio. Para examinar la muestra, el capilar de vidrio se coloca en una cámara de muestras llena de agua y la agarosa con la muestra se saca a presión ligeramente fuera del capilar. La muestra se ilumina con una lámina de luz. La fluorescencia excitada en la muestra y procedente de la misma se visualiza en un detector, especialmente en una cámara, utilizando un objetivo de detección perpendicular a la lámina de luz y, por consiguiente, también perpendicular a la óptica de lámina de luz.

10 Según el estado de la técnica, una estructura de un microscopio 1 para la microscopía de lámina de luz (estructura SPIM; Single Plane Illumination Microscopy) comprende un objetivo de iluminación 2 y un objetivo de detección 3 (en adelante también denominados objetivos SPIM) orientados respectivamente hacia el plano de muestra 4 desde arriba en un ángulo de 45° con respecto a un plano de muestra 4 y en ángulo recto entre sí (véase figura 1a). Una muestra 5 dispuesta en el plano de muestra 4 se encuentra, por ejemplo, en la base de un portamuestras 7 configurado como una placa de Petri. El portamuestras 7 se llena con un líquido 8, por ejemplo, agua, y los dos objetivos SPIM 2, 3 se sumergen en el líquido 8 (no mostrado) durante la aplicación de la microscopía de lámina de luz. El plano de muestra 4 se extiende en un plano X-Y formado por el eje X X y por el eje Y Y de un sistema de coordenadas cartesianas. El primer eje óptico A1 y el segundo eje óptico A2 se desarrollan en un plano Y-Z formado por el eje Y Y y por el eje Z Z del sistema de coordenadas cartesianas.

20 Este método ofrece la ventaja de una alta resolución en la dirección axial, dado que por medio del objetivo de iluminación 2 se puede generar una lámina de luz fina 6. Gracias a la mayor resolución, se pueden examinar muestras más pequeñas 5. Adicionalmente, la fluorescencia de fondo perturbadora se reduce considerablemente y, por lo tanto, se mejora la relación señal/fondo.

25 Según el estado de la técnica, una imagen general paralelamente al plano de muestra 4 y al portamuestras 7 se genera tomando con un objetivo de campo amplio 20 por debajo de la muestra 5 una imagen de campo amplio perpendicularmente a través de la base transparente del portamuestras 7. En este caso no son posibles una iluminación por transmisión de la muestra 5 y una detección de la luz transmitida, dado que los dos objetivos SPIM 2, 3 están dispuestos demasiado cerca uno de otro.

30 Para que sea posible una preparación de muestras más sencilla en contenedores de muestras estándar como, por ejemplo, placas multipocillo, se puede mantener la configuración de 45° , pero los dos objetivos SPIM 2, 3 se orientan en una disposición inversa desde abajo a través de la base transparente del portamuestras 7 hacia el plano de muestra 4 (figura 1b). En esta disposición, las aberraciones provocadas por el portamuestras 7, que está inclinado relativamente con respecto a los ejes ópticos A1 y A2 y está disponible en forma de un cubreobjetos, deben corregirse mediante elementos ópticos especiales. La muestra 5 dispuesta en el plano de muestra 4 se ilumina a través de la base del portamuestras 7 y se detecta una fluorescencia excitada de la muestra 5. Se pueden utilizar portamuestras 35 como, por ejemplo, placas multipocillo, placas de Petri y/o portaobjetos, y se puede evitar una contaminación de las muestras 5 especialmente durante el cribado de alto rendimiento.

40 Otras dificultades técnicas surgen si en el haz luminoso del objetivo de iluminación 2 y/o del objetivo de detección 3 se disponen, por ejemplo, placas de Álvarez 12 (figura 1b) (US 3305294). Las placas de Álvarez 12 se configuran de manera que corrijan las aberraciones que se producen exactamente en un ángulo fijo entre el portamuestras 7, por ejemplo, un cubreobjetos, y el eje óptico A1, A2 del respectivo objetivo 2, 3. Incluso en caso de una pequeña desviación del ángulo (por ejemplo, $<0,1^\circ$), se producen aberraciones no deseadas que dan lugar a una menor calidad de imagen. Por este motivo, antes de iniciar un experimento, el cubreobjetos, por ejemplo, debe alinearse de manera que la desviación angular se encuentre dentro de las tolerancias admisibles. Adicionalmente resulta útil poder ajustar, además del ángulo, la distancia entre el objetivo 2, 3 o una eventual lente adicional existente (por ejemplo, una lente de menisco) y el cubreobjetos, de manera que la muestra 5 o su zona a reproducir se encuentre en el plano de imagen BE del objetivo de detección 3.

50 Por los documentos US 2008/0111911 A1 y WO 2010/135323 A1 se conocen soluciones técnicas para la detección y el ajuste de un portamuestras en un microscopio. La estructura de un microscopio de lámina de luz invertido se describe en el documento DE 10 2013 107 297 A1.

55 Por el documento DE 10 2007 046 601 A1 se conoce un dispositivo para el ajuste de una lámpara en un sistema de luz reflejada. En este sistema se dispone al menos un diafragma de apertura en un haz luminoso de iluminación de luz reflejada. En un haz luminoso de detección del sistema de luz reflejada se dispone un detector. En una sección del sistema de luz reflejada, el haz luminoso de iluminación de luz reflejada y el haz luminoso de detección se desarrollan conjunta y paralelamente. En la sección del sistema de luz reflejada se puede posicionar un elemento óptico, reproduciendo el elemento óptico el diafragma de apertura en el detector.

5 El documento DE 10 2008 007 178 A1 se refiere a un dispositivo de calibración de un microscopio de escaneo láser que presenta, alineados fijamente entre sí en un soporte común, una óptica de enfoque y una estructura de prueba dispuesta en el plano focal de la óptica de enfoque con elementos estructurales detectables en la luz reflejada y/o en la luz transmitida. La estructura de prueba puede intercalarse en el haz luminoso del microscopio de manera que la pupila de la óptica de enfoque coincida con la pupila del objetivo del microscopio de escaneo láser o se encuentre en un plano conjugado con la misma.

10 Por la publicación de McGorty et al. (2015: Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens; OPTICS EXPRESS 23: 16142 - 16153) se conoce una posibilidad para corregir las aberraciones de un microscopio causadas por un cubreobjetos. El microscopio SPIM invertido presenta un prisma de agua, cuyo efecto compensa parcialmente las aberraciones que se producen como consecuencia del paso oblicuo de la luz de detección a través del cubreobjetos.

La invención se basa en el objetivo de proponer un procedimiento para el ajuste de un portamuestras en el haz luminoso de un microscopio.

15 La tarea se resuelve con el objeto de la reivindicación independiente 1. En las reivindicaciones dependientes se indican configuraciones ventajosas.

20 La tarea se resuelve con un procedimiento para el ajuste de un portamuestras en el haz luminoso de un microscopio, en el que al menos un haz de una radiación de iluminación se dirige al portamuestras. Una parte de la radiación de iluminación reflejada por el portamuestras se detecta por medio de un detector y se determinan los valores de medición de la radiación de iluminación detectada. En dependencia de estos valores de medición se determina un posicionamiento real actual, en adelante también denominado posición real, del portamuestras con respecto al haz luminoso. El posicionamiento real determinado se compara con un posicionamiento teórico, en adelante también denominado posición teórica, y se generan comandos de control para la modificación del posicionamiento real, moviéndose el portamuestras, mediante la ejecución de los mismos, al posicionamiento teórico.

25 La parte esencial de la invención consiste en el uso de una parte reflejada (reflejo) de la radiación de iluminación para realizar un ajuste del portamuestras, por ejemplo, de un cubreobjetos, con respecto a su posición angular y a su distancia con respecto al haz luminoso.

30 En los lados superior e inferior de, por ejemplo, los cubreobjetos suele haber reflejos de partes de la radiación de iluminación. Los reflejos en estas superficies límite suelen producirse con un grado de reflexión de aproximadamente un 3% respectivamente. En este caso, la parte reflejada de la radiación de iluminación suele encontrarse casi completamente dentro de la NA de detección. Esto tiene como consecuencia que la parte reflejada puede reproducirse en gran medida en un detector conectado ópticamente al objetivo de detección. Esta parte reflejada puede utilizarse para realizar un ajuste del cubreobjetos con respecto al ángulo y a la distancia.

35 No es necesario determinar un posicionamiento real en términos absolutos, por ejemplo, en forma de coordenadas de un sistema de coordenadas independiente. En las configuraciones del procedimiento también se puede determinar una posición real en forma de relaciones de posición relativas con respecto al haz luminoso.

El posicionamiento teórico se logra cuando el portamuestras adopta un posicionamiento esperado o deseado. Se puede determinar una tolerancia admisible del posicionamiento teórico.

40 En una configuración de la invención, la radiación de iluminación se proporciona como al menos un haz de rayos individuales (haz de luz) y se dirige al portamuestras. En este caso, en distintas realizaciones del procedimiento según la invención, la radiación de iluminación puede ser una radiación con haces autorreconstruibles o haces no difractivos (en inglés: non-diffractive beams) y puede configurarse, por ejemplo, en forma de un haz gaussiano, un haz de Bessel, un haz de Mathieu, un haz Sinc³, una lámina de luz de celosía, un haz de Bessel coherente, un haz de Bessel seccionado o un haz de Airy, y dirigirse al portamuestras.

45 Un haz de Mathieu puede considerarse como un campo óptico de propagación invariante (propagation-invariant optical field) según la ecuación de Helmholtz con coordenadas elípticas (Gutiérrez-Vega, J. C. et al, 2001: Experimental demonstration of optical Mathieu beams; Optics Communications 195: 35 - 40).

50 En una configuración alternativa del procedimiento según la invención, la radiación de iluminación se dirige al portamuestras en forma de una lámina de luz. En este caso, en una configuración del procedimiento, la lámina de luz puede generarse con una radiación de iluminación de una longitud de onda diferente a la longitud de onda de una radiación de iluminación utilizada para la obtención de imágenes. De este modo se reduce ventajosamente una degradación de la calidad de imagen y se puede mitigar un efecto de blanqueo de la radiación de iluminación en la muestra mediante una selección específica de la longitud de onda utilizada para la generación de la lámina de luz y de su intensidad.

Por consiguiente, es posible utilizar diferentes haces de iluminación, por ejemplo, para llevar a cabo diferentes pasos parciales del procedimiento según la invención.

5 En una configuración del procedimiento según la invención se utiliza un microscopio configurado como un microscopio invertido. El microscopio invertido comprende un objetivo de iluminación con un primer eje óptico, atravesando el primer eje óptico un plano de muestra formado por un eje X y un eje Y ortogonal al eje X. Además, se dispone de un objetivo de detección, configurado para la detección de la luz procedente del plano de muestra, con un segundo eje óptico, alineándose el objetivo de iluminación y el objetivo de detección entre sí y con respecto al plano de muestra, de manera que el primer eje óptico y el segundo eje óptico se crucen en el plano de muestra y formen un ángulo fundamentalmente recto. El primer eje óptico y el segundo eje óptico forman respectivamente un ángulo distinto de 10 cero con un tercer eje dirigido ortogonalmente al plano de muestra en la dirección de un eje Z y que sirve como eje de referencia.

La configuración antes indicada resulta especialmente adecuada para la microscopía de lámina de luz.

15 En la configuración según la invención del procedimiento, éste presenta dos pasos. A continuación, las posiciones de la imagen de la parte reflejada en el detector, especialmente en una superficie de detección del detector, se denominan posición real o posición teórica.

20 En un paso 1, el portamuestras que presenta una base transparente a la radiación de iluminación con una primera superficie lateral y una segunda superficie lateral se desplaza en la dirección del eje Z hasta que se detecta la parte de la radiación de iluminación reflejada por la primera superficie lateral, por ejemplo, la superficie superior, de la base. La posición relativa del portamuestras y del detector se modifica una respecto a otra, de manera que una posición real de la parte detectada se aproxime a una posición teórica en el detector. Ventajosamente, la posición teórica se centra en la superficie del detector para, durante el ajuste de la posición teórica, evitar en gran medida una posición real de la parte reflejada fuera de la superficie del detector.

25 La base puede ser, por ejemplo, la base de un cuenco, por ejemplo, de vidrio o de plástico. También es posible que un cubreobjetos con su primera y su segunda superficie lateral sea una base en el sentido antes mencionado. Es importante una transparencia suficiente del material de la base para la radiación de iluminación o para las radiaciones de iluminación, así como que la primera superficie lateral y la segunda superficie lateral actúen como superficies límite en las que puedan producirse refracciones y/o reflexiones de la radiación de iluminación.

30 En un paso 2 se comprueba la presencia de una inclinación de la primera superficie lateral de la base alrededor del eje Y, determinándose una desviación angular de la posición real con respecto a la posición teórica. Si aquí se determina una desviación angular superior a una desviación angular admisible, el portamuestras se gira sobre el eje Y hasta que se minimiza la desviación angular. Opcionalmente se puede determinar una dirección de giro preferible para la compensación de la inclinación, a fin de, por ejemplo, compensar la desviación angular en el recorrido de giro más corto. A continuación, se comprueba una existencia de una desviación de la posición teórica con respecto a la posición real en la dirección del eje Z. En caso de producirse una desviación inadmisiblemente, se repite el paso 1 y, en su 35 caso, el paso 2. Después del paso 2, el portamuestras se orienta paralelamente al eje X.

40 Opcionalmente, en un paso 3, se comprueba una alineación de la primera superficie lateral en la dirección del eje Y, desplazándose el portamuestras en la dirección del eje Y y detectándose una desviación de la dirección del eje Y mediante una desaparición de la parte reflejada detectada en el detector. Si se produce la desaparición, es decir, la posición real, de la parte reflejada detectada, el portamuestras se gira alrededor del eje X hasta que ya no se produzca ninguna desaparición más o hasta que la misma se encuentre dentro de un límite de tolerancia admisible.

45 En otra configuración del procedimiento, el portamuestras ajustado se desplaza en la dirección del eje Z desde una primera posición (teórica), en la que se detecta una parte reflejada por la primera superficie lateral en una primera posición teórica, hasta que la imagen de la parte reflejada detectada alcanza una segunda posición teórica, en la que se detecta una parte reflejada por la segunda superficie lateral, por ejemplo, el lado inferior, de la base. En dependencia del recorrido de desplazamiento en la dirección del eje Z realizado entre la primera posición teórica y la segunda posición teórica, se determina una distancia real entre la primera y la segunda superficie lateral en la dirección del eje Z. La distancia así determinada corresponde al grosor de la base.

Se puede calcular la distancia o el grosor de la base. A continuación, se indica una posibilidad de cálculo en relación con los ejemplos de realización.

50 La detección de la parte reflejada se realiza por medio de un detector, por ejemplo, por medio de una cámara, que comprende, por ejemplo, un chip CCD o CMOS, o por medio de un diodo de cuatro cuadrantes.

Por sistemas de microscopios convencionales se entienden tanto microscopios de luz reflejada, como también microscopios de luz transmitida en una realización por debajo (disposición invertida) o con objetivos dispuestos por encima del plano de muestra.

En una configuración de un procedimiento que no forma parte de la invención, la radiación de iluminación se dirige hacia el portamuestras mediante un telescopio de autocolimación y el posicionamiento real (inclinación) del portamuestras se determina en dependencia de una desviación de una posición real de la parte reflejada detectada en el detector con respecto a una posición teórica de la parte reflejada detectada en el detector.

- 5 En función de la desviación determinada se determina un ángulo de inclinación del portamuestras. Si el ángulo de inclinación determinado es mayor que una tolerancia admisible del ángulo de inclinación, el posicionamiento real del portamuestras se modifica para ajustar un ángulo de inclinación dentro de la tolerancia admisible, generándose y ejecutándose los correspondientes comandos de control.

Esta configuración del procedimiento resulta adecuada para microscopios invertidos, así como verticales.

- 10 En una configuración que no forma parte de la invención es posible además que la radiación de un láser colimado se dirija como radiación de iluminación hacia el portamuestras paralelamente a la línea vertical, reflejándose y detectándose una reflexión que se produce. Para la detección se puede utilizar un diodo de cuatro cuadrantes.

- 15 Otra configuración del procedimiento no conforme a la invención se caracteriza por que se define una medida de calidad de imagen, por que se modifica un posicionamiento real del portamuestras, por ejemplo, de forma escalonada (iterativa), y por que se detectan, asignados a cada uno de los posicionamientos reales elegidos, valores de medición de la medida de calidad de imagen o valores de medición de las partes reflejadas detectadas.

- 20 Por medio de los valores de medición de la medida de calidad de la imagen o de los valores de medición de las partes reflejadas detectadas, se determina respectivamente un valor actual de la medida de calidad de la imagen y se selecciona un posicionamiento real en el que está disponible una medida de calidad de imagen deseada, por ejemplo, máxima o maximizada.

El posicionamiento real seleccionado puede establecerse como el futuro posicionamiento teórico.

Los valores de medición de la medida de calidad de imagen o los valores de medición de las partes reflejadas detectadas pueden deducirse, por ejemplo, del portamuestras (y)/o de un perfil de haz de la radiación de iluminación. Esta configuración resulta adecuada para los sistemas de microscopios invertidos.

- 25 Un reflejo de la radiación de iluminación puede utilizarse además en un procedimiento que no forma parte de la invención, en el que se determina una topografía del portamuestras, especialmente una topografía de la primera y/o de la segunda superficie lateral, determinándose valores de altura relativos en al menos tres puntos, en adelante también denominados puntos de medición, del portamuestras y determinándose el posicionamiento real (inclinación) del portamuestras en dependencia de los valores de altura determinados.

- 30 La topografía se determina mediante las alturas relativas de los puntos medidos en la superficie del portamuestras que se indican mediante valores de altura relativos. Las alturas relativas se indican, por ejemplo, en forma de coordenadas en la dirección del eje Z. Una determinación de la topografía puede llevarse a cabo mediante diferentes variantes.

- 35 Por ejemplo, es posible el uso de un interferómetro (que no forma parte de la invención). En este caso, la radiación de iluminación se dirige hacia el portamuestras por medio de un interferómetro (de fibra) y el posicionamiento real del portamuestras se determina en dependencia de una desviación de una posición real de la parte reflejada detectada en el detector con respecto a una posición teórica de la parte reflejada detectada en el detector.

- 40 Además, en otra variante no conforme a la invención se puede generar una imagen del portamuestras y se pueden determinar los valores de calidad de imagen de al menos una medida de calidad de imagen en al menos tres puntos de imagen. Los valores de altura correspondientes a los tres puntos de imagen se determinan en dependencia de los valores de calidad de imagen.

- 45 Según la invención, la topografía también puede determinarse mediante triangulación. Con esta finalidad se detecta un punto de medición desde al menos dos puntos de observación diferentes. Un punto de medición es un punto a medir en una superficie del portamuestras. Se determina el respectivo ángulo de observación en el que se encuentra el punto de medición observado desde el respectivo punto de observación y se determina un posicionamiento real del punto de medición en dependencia de los puntos de observación y de los ángulos de observación correspondientes. En función del posicionamiento real del al menos un punto de medición se determina el posicionamiento real del portamuestras. Se miden al menos tres puntos de medición.

- 50 La invención se refiere a una posibilidad para el ajuste del portamuestras, por ejemplo, para la medición de la inclinación y para la corrección de la inclinación del cubreobjetos, especialmente en caso de SPIM. Ventajosamente, el procedimiento según la invención puede utilizarse para la microscopía de lámina de luz utilizando un microscopio invertido equipado con un objetivo de detección y con un objetivo de iluminación que son perpendiculares entre sí y que iluminan o detectan desde abajo a través de un cubreobjetos respectivamente en ángulo.

Especialmente en caso de microscopios con una disposición invertida y trayectorias de rayos inclinadas, es esencial la medición de la inclinación y, si es necesario, la corrección de la inclinación, dado que se producen aberraciones considerables incluso en caso de inclinaciones más pequeñas.

5 La invención se explica a continuación más detalladamente a la vista de ejemplos de realización y de las figuras. Aquí se muestra en la:

Figura 1a una representación esquemática de un microscopio con una disposición de 45° del objetivo de iluminación y del objetivo de detección por encima, así como con un objetivo de campo amplio por debajo de un plano de muestra según el estado de la técnica;

10 Figura 1b una representación esquemática de un microscopio con una disposición inversa de 45° del objetivo de iluminación y del objetivo de detección por debajo, así como con un objetivo de campo amplio por encima de un plano de muestra según el estado de la técnica;

Figura 2 una representación esquemática de un ejemplo de realización de un microscopio configurado para la microscopía de lámina de luz con placas de Álvarez y lente de menisco;

Figura 3 una representación esquemática de un ejemplo de realización de un microscopio de lámina de luz invertido;

15 Figura 4 una representación esquemática de un esquema de principio de las relaciones de reflexión y apertura en un portamuestras de un microscopio invertido;

Figura 5 una representación esquemática de la posición de una lámina de luz en una muestra y de una imagen de una parte reflejada de la lámina de luz en un detector;

20 Figura 6 una representación esquemática de la reflexión de un haz de iluminación en el lado superior de un portamuestras;

Figura 7 una representación esquemática de una imagen inclinada de una parte reflejada de la radiación de iluminación en un detector;

Figura 8 una representación esquemática del principio del ajuste del portamuestras paralelamente al eje Y;

Figura 9 una representación esquemática del principio de la determinación del grosor del portamuestras;

25 Figura 10 una representación esquemática de una disposición para la determinación de la topografía del portamuestras mediante un interferómetro y

Figura 11 una representación esquemática de una disposición para la determinación de la topografía del portamuestras mediante triangulación.

30 En las siguientes representaciones esquemáticas de ejemplos del estado de la técnica y de ejemplos de realización de la invención, las referencias iguales se refieren a los mismos elementos.

35 Por el estado de la técnica se conoce un microscopio vertical 1, representado esquemáticamente en la figura 1a, que presenta un objetivo de iluminación 2, un objetivo de detección 3 y un objetivo de campo amplio 20. Por medio del objetivo de iluminación 2 se genera o se puede generar una lámina de luz 6 a lo largo de un primer eje óptico A1 que puede utilizarse para examinar una muestra 5 dispuesta en un plano de muestra 4. El objetivo de detección 3 presenta un segundo eje óptico A2 a lo largo del cual se puede detectar la luz procedente del plano de muestra 4. El primer eje óptico A1 y el segundo eje óptico A2 están alineados ortogonalmente uno respecto a otro y forman respectivamente un ángulo de 45° con el plano de muestra 4 que sirve de plano de referencia.

40 El objetivo de campo amplio 20 presenta un tercer eje óptico A3 que está dirigido ortogonalmente al plano de muestra 4 y que sirve como eje de referencia B. Los ejes ópticos primero a tercero A1 a A3 se cruzan en la zona de la extensión de la lámina de luz 6 en la muestra 5. Además, el primer eje óptico A1 forma con el eje de referencia B un primer ángulo α_1 y el segundo eje óptico A2 forma con el eje de referencia B un segundo ángulo α_2 de $90^\circ - \alpha_1$, por ejemplo, respectivamente de 45°.

La muestra 5 se dispone en un portamuestras 7 que se encuentra en una mesa de muestras 11 y que está lleno de un líquido 8.

45 La figura 1b muestra esquemáticamente un microscopio 1 con una disposición inversa del objetivo de iluminación 2 y del objetivo de detección 3, en el que el objetivo de iluminación 2 y el objetivo de detección 3 se disponen por debajo y el objetivo de campo amplio 20 por encima del plano de muestra. Los ángulos α_1 y α_2 son de nuevo de 45° respectivamente.

ES 2 909 610 T3

Los siguientes ejemplos de realización de la invención se representan por medio de un microscopio invertido 1.

En la figura 2 se representa un ejemplo de realización de un microscopio invertido 1 configurado para la microscopía de lámina de luz con placas de Álvarez 12 y con una lente de menisco 10. Los ángulos α_1 y α_2 son de 45° respectivamente. Las placas de Álvarez 12 sirven para corregir las aberraciones que pueden producirse debido al paso oblicuo de la radiación de iluminación BS a través de la base del portamuestras 7. La lente de menisco 10 apoya el paso de la radiación de iluminación BS desde el aire a un elemento de inmersión 18 y al líquido 8, así como para una radiación de detección DS desde el líquido 8 al elemento de inmersión 18 y al aire.

El portamuestras 7 está sujeto en la mesa de muestras 11. La propia mesa de muestras 11 se puede ajustar de forma controlada en un plano X-Y formado por el eje X X y por el eje Y Y por medio de accionamientos no representados en detalle.

El objetivo de iluminación 2 y el objetivo de detección 3 se pueden ajustar respectivamente de forma controlada a lo largo del primer eje óptico A1 o a lo largo del segundo eje óptico A2 por medio de un accionamiento de objetivo 14 configurado aquí como un accionamiento piezoeléctrico.

La radiación de iluminación BS se pone a disposición mediante un módulo láser 15 y se conforma mediante una unidad de conformación de haz 16. La unidad de conformación de haz 16 es, por ejemplo, una unidad óptica mediante la cual, por ejemplo, se colima la radiación de iluminación proporcionada BS.

A continuación de la unidad de conformación de haz 16 está disponible un escáner 17 mediante el cual la radiación de iluminación conformada BS puede desviarse en dos direcciones de forma controlada (escáner X-Y).

Aguas abajo del escáner, el objetivo de iluminación 2 se dispone en el primer eje óptico A1. La radiación de iluminación BS desviada por el escáner 17 llega al objetivo de iluminación 2 y se conforma y/o enfoca mediante el mismo.

La radiación de detección DS se dirige a lo largo del segundo eje óptico A2 hacia un detector 19, pudiendo este último detectarla.

Para el control de la mesa de muestras 11, de los accionamientos piezoeléctricos 14, de las placas de Álvarez 12, del módulo láser 15, de la conformación de haz 16, del escáner 17 y/o del detector 19, se proporciona una unidad de control 13 conectada adecuadamente a los elementos a controlar para la transmisión de datos.

En otras realizaciones, la unidad de control 13 se configura adicionalmente para el registro, el almacenamiento y/o la evaluación de los valores de medición. Por medio de la unidad de control 13 se pueden controlar otros elementos, así como unidades del microscopio 1 y/o recibir y evaluar valores de medición de los mismos.

A continuación, se utilizan para la descripción dos sistemas de coordenadas con ejes ortogonales unos respecto a otros. El primer sistema de coordenadas es el sistema de coordenadas de todo el dispositivo con un eje X X, un eje Y Y y un eje Z Z. En un caso ideal, el portamuestras 7, especialmente su base, se orienta paralelamente a un plano X-Y formado por el eje X X y el eje Y Y. El segundo sistema de coordenadas es el sistema de coordenadas del detector 19 con el eje X X, con un eje y' y con un eje z z'. Una reproducción de, por ejemplo, una imagen del plano de imagen BE en el detector 19 tiene las coordenadas X e y'. El eje X X es idéntico en ambos sistemas de coordenadas y se orienta ortogonalmente al plano de dibujo de las figuras. Los otros dos ejes Y e y' o Z y z' pueden transformarse el uno en el otro mediante una rotación alrededor del eje X X.

Los siguientes ejemplos de realización se basan a modo de ejemplo en un microscopio de lámina de luz invertido, en el que el primer eje óptico A1 del objetivo de iluminación 2 forma un ángulo α_1 de 60° con respecto al eje de referencia B y el segundo eje óptico A2 del objetivo de detección 3 forma un ángulo α_2 de 30° (figura 3). Para una mayor claridad, en todas las figuras no se representa una lente de menisco opcional 10. Además, para el portamuestras 7, por ejemplo, en forma de un cubreobjetos o de la base del portamuestras 7, se toma como base un índice de refracción de $n = 1,52$ y para el agua como elemento de inmersión 18 se toma como base un índice de refracción de $n = 1,33$.

En la figura 4, las aperturas numéricas NA1, NA2 se muestran como ángulos de apertura del objetivo de iluminación 2 o del objetivo de detección 3. El objetivo de iluminación 2 presenta una apertura numérica NA1 de 0,45, mientras que el objetivo de detección 3 presenta una apertura numérica NA2 de 1,0. Para una mayor claridad, la representación no es a escala.

El eje de referencia B se desarrolla en un ángulo de 0° . El primer eje óptico A1 se desarrolla en un ángulo α_1 de -60° . La primera apertura numérica NA1 forma un cono de -40° a -80° . El segundo eje óptico A2 se desarrolla en un ángulo α_2 de 30° . La segunda apertura numérica NA2 forma un cono de -19° a 79° .

El material del portamuestras 7 es transparente a la radiación de iluminación BS. En las superficies límite entre el elemento de inmersión 18 y el portamuestras 7, así como entre el portamuestras 7 y la muestra 5, se refleja una parte de la radiación de iluminación BSref. El grado de reflexión es respectivamente del 3% aproximadamente. El cono de

iluminación formado por la parte reflejada de la radiación de iluminación BSref oscila entre 40° y 80° y se encuentra casi por completo dentro de la segunda apertura numérica NA2 del objetivo de detección 3. Esto permite visualizar la parte reflejada de la radiación de iluminación BSref (= reflejo BSref) prácticamente por completo en el detector 19 (véanse figuras 2, 3 y 5). El reflejo BSref puede utilizarse para llevar a cabo un posicionamiento real del portamuestras 7 y para realizar un ajuste del portamuestras 7 en dependencia del posicionamiento real determinado.

Para ilustrar la transformación del reflejo BSref desde el sistema de coordenadas de todo el dispositivo al sistema de coordenadas del detector 19, en la figura 5 se muestra esquemáticamente el contorno de un soporte de muestras 7, por ejemplo, de un cubreobjetos. En el portamuestras 7 ya se configura la lámina de luz 6. La lámina de luz 6 incide con su sección transversal en un lado superior como una primera superficie lateral OS del portamuestras 7, en la que se refleja una parte de la lámina de luz 6, es decir, una parte de la radiación de iluminación 3, y se dirige como reflejo BSref a través de un lado inferior como una segunda superficie lateral US del portamuestras 7 hacia una superficie de detección 19.1 de un detector 19, visualizándose allí como una imagen 60 de la sección transversal de la lámina de luz.

La superficie de detector 19.1 se representa en la figura 5 en una vista en planta, mientras que el portamuestras 7 y la lámina de luz 6 se representan en una vista lateral. A partir de estas vistas giradas una respecto a otra resulta la orientación representada del sistema de coordenadas del detector 19 con los ejes X, y' y z'.

La realización de un procedimiento según la invención y las posibles configuraciones se describen por medio de las figuras 6 a 9.

En la figura 6 se representa un haz luminoso a modo de ejemplo de la radiación de iluminación BS y de la radiación de detección DS. La radiación de iluminación BS se dirige a lo largo del primer eje óptico A1 en un ángulo de 60° con respecto a la perpendicular del lado inferior US del portamuestras 7. Cuando la radiación de iluminación BS pasa a través de la superficie límite formada por el lado inferior US entre el aire con un índice de refracción $n = 1,33$ y el material del portamuestras 7 con un índice de refracción $n = 1,52$, la radiación de iluminación BS se refracta hacia la perpendicular y se desarrolla hasta el lado superior OS del portamuestras 7 en un ángulo de 48°.

En la primera superficie lateral OS, la reflexión de la parte de la radiación de iluminación BSref (véase también figura 5) hacia la segunda superficie lateral US tiene lugar en un plano de imagen BE. Cuando la parte reflejada de la radiación de iluminación BSref pasa a través de la segunda superficie lateral US, ésta se refracta alejándose de nuevo de la perpendicular y llega, por ejemplo, al detector 19 (no mostrado) a lo largo del segundo eje óptico A2 como radiación de detección DS.

Para ajustar el portamuestras 7, en un paso 1 el portamuestras 7 se desplaza en la dirección del eje Z (Z) hasta que se detecta la parte de la radiación de iluminación BSref reflejada por la primera superficie lateral OS, en el ejemplo de realización representado, por el lado superior. En este caso se parte de la base de que el plano de imagen BE es fijo. Una posición relativa del portamuestras 7 y del detector 19 una respecto a otra se modifica de manera que una posición real de la parte de la radiación de iluminación BSref detectada como imagen 60 se aproxime a una posición teórica de la imagen 60 en la superficie de detector 19.1 del detector 19 (figura 7).

La posición real del portamuestras 7 en la dirección del eje Z se ajusta óptimamente si la imagen 60 de la sección transversal de la lámina de luz 6 se sitúa de forma centrada en la superficie de detector 19.1.

Dado que existe un reflejo BSref tanto en la primera superficie lateral OS, como también en la segunda superficie lateral US del cubreobjetos, es necesario poder distinguir entre ambas. Si el portamuestras 7 se mueve en una dirección positiva (hacia arriba en la figura 6) a lo largo del eje Z Z, en primer lugar, se puede posicionar el reflejo BSref en la primera superficie lateral OS de forma centrada en la superficie de detector 19.1. El reflejo BSref causado por la segunda superficie lateral US puede ajustarse de forma centrada sólo en caso de un desplazamiento posterior en la dirección positiva a lo largo del eje Z Z.

Si la sección transversal de la lámina de luz 7 se ajusta de forma centrada resulta una reproducción centrada de la imagen 60 en la superficie de detector 19, como se representa esquemáticamente en la figura 7.

En un paso 2 se comprueba la presencia de una inclinación de la primera superficie lateral OS alrededor del eje Y, determinándose una desviación angular de la posición real con respecto a la posición teórica. La posición teórica se muestra en la figura 7 a modo de ejemplo mediante una línea de puntos que se desarrolla horizontalmente a través de la superficie de detector 19.1. Al alcanzar la posición teórica, un eje longitudinal de la imagen 60 debe coincidir completamente o casi completamente con la línea horizontal de puntos. En el ejemplo representado en la figura 7, el eje longitudinal de la imagen 60 está inclinado en un ángulo β con respecto a la posición teórica. La posición real actual de la imagen 60 difiere de la posición teórica.

Si se detecta una desviación angular mayor que una desviación angular admisible, el portamuestras 7 se gira alrededor del eje Y Y hasta que el ángulo β se minimiza.

A continuación, se comprueba si se ha producido una desviación de la posición teórica con respecto a la posición real en la dirección del eje Z Z. Si, por ejemplo, como consecuencia de la corrección de la desviación angular, se produce una desviación inadmisibles de la posición real en la dirección del eje Z Z, se repite el primer paso 1 antes descrito. La muestra es ahora paralela al eje X.

5 En un paso opcional 3, el portamuestras 7, especialmente la primera superficie lateral OS, también se orienta adicionalmente de forma paralela al eje Y Y. Para ello, el portamuestras 7 se desplaza a lo largo del eje Y Y, como se muestra esquemáticamente en la figura 8. Si el portamuestras 7, especialmente la primera superficie lateral OS, no se orienta paralelamente al eje Y Y, se produce un desplazamiento de la imagen 60 de la sección transversal de la lámina de luz en la superficie de detector 19.1 en la dirección y' .

10 En la figura 8 se representan el portamuestras 7 en una posición real actual, así como la imagen correspondiente 60 en la superficie de detector 19.1 con líneas continuas. En la figura 8 se muestran enmarcadas con líneas discontinuas una posición real de un portamuestras virtualmente desplazado 7', así como una imagen virtual correspondiente 60' de la sección transversal de la lámina de luz del portamuestras virtualmente desplazado 7'. Lo mismo se aplica a los haces luminosos respectivamente correspondientes de la radiación de iluminación BS y de la parte reflejada de la radiación de iluminación BSref.

15 Durante el proceso de desplazamiento, el primer eje óptico A1 permanece estacionario. Como resultado, la primera superficie lateral OS del portamuestras desplazado 7' está desplazada en una medida en la dirección del eje Z Z, por lo que la imagen 60' del portamuestras desplazado 7' incide en la superficie de detector 19.1 desplazada en la dirección del eje y' .

20 La orientación de la primera superficie lateral OS en la dirección del eje Y Y se comprueba desplazando el portamuestras 7 en la dirección del eje Y Y. Si se detecta una desviación de la dirección del eje Y Y como consecuencia de una desaparición de la parte reflejada detectada BSref en el detector 19, especialmente en la superficie de detector 19.1, el portamuestras 7 se gira alrededor del eje X X por medio de accionamientos controlados, por ejemplo, de la mesa de muestras 11, hasta que ya no se produzca ninguna desaparición o hasta que se produzca una desaparición dentro de un límite de tolerancia admisible.

25 Mediante la inclinación del portamuestras 7 alrededor del eje X X, éste se alinea ahora de manera que no se produzca ninguna desaparición de la imagen 60 de la sección transversal de la lámina de luz en la dirección del eje y' durante su desplazamiento en la dirección del eje Y Y. Si, en este caso, se produce un desplazamiento inadmisibles del portamuestras 7 en la dirección del eje Z Z, se repite el paso 1.

30 El ajuste descrito del portamuestras 7 puede complementarse con una determinación del grosor d , por ejemplo, de la base del portamuestras 7. A continuación, se hace referencia al grosor d de la base de un portamuestras 7 o al grosor d de un cubreobjetos utilizado como portamuestras 7.

35 Las aberraciones que se producen cuando la radiación de iluminación BS pasa oblicuamente a través del portamuestras 7 dependen de su grosor d . Por este motivo, por ejemplo, las placas de Álvarez 12 (figura 2) se alojan de forma desplazable en el objetivo de iluminación 2 y/o en el objetivo de detección 3 para ajustar una corrección de la aberración al grosor d mediante un desplazamiento de las placas de Álvarez 12 unas respecto a otras.

El grosor d del portamuestras 7 puede determinarse por medio de los reflejos BSref de la primera y de la segunda superficie lateral OS, US. En la figura 9 se representan esquemáticamente los dos reflejos BSref, siendo d el grosor del cubreobjetos y siendo d' el desplazamiento del cubreobjetos en la dirección positiva a lo largo del eje Z Z.

40 La determinación del grosor d se realiza del siguiente modo:

45 En primer lugar, el portamuestras 7 se ajusta de manera que el reflejo BSref de la primera superficie lateral OS se sitúe en la posición teórica, por ejemplo, en el centro, como imagen 60 en la superficie de detector 19.1 (véanse figuras 5, 7, 8) y de manera que el portamuestras 7 no presente ninguna inclinación. En el ejemplo, el ángulo entre la radiación de iluminación BS y el eje de referencia B es de 48° . El eje de referencia B se desarrolla por el plano de imagen BE y por el punto de incidencia, representado de forma simplificada, de la radiación de iluminación BS en la primera superficie lateral OS. En la dirección del eje Y Y, Δy se refiere a un recorrido entre el punto de paso de la radiación de iluminación BS a través de la segunda superficie lateral US y un punto de incidencia en la primera superficie lateral US.

50 A continuación, el portamuestras 7 se desplaza en dirección positiva a lo largo del eje Z Z hasta que el reflejo BSref de la segunda superficie lateral US se encuentra en la posición teórica como imagen 60 en la superficie de detector 19.1. Se determina el recorrido de desplazamiento d' necesario para ello, por ejemplo, se mide o se calcula. En el ejemplo, el ángulo entre la radiación de iluminación BS y el eje de referencia B es ahora de 60° .

El grosor d puede calcularse por medio de las siguientes relaciones trigonométricas y de los ángulos indicados en el ejemplo:

$$\tan(60^\circ) = \Delta y/d'$$

$$\tan(48^\circ) = \Delta y/d$$

siendo Δy la distancia entre el paso de la radiación de iluminación BS y el eje de referencia B medido en la dirección del eje X X.

5 El grosor d se calcula a partir de $d' * \tan(60^\circ)/\tan(48^\circ)$.

En otras configuraciones del procedimiento puede llevarse a cabo adicional o alternativamente una corrección de la inclinación, generándose una lámina de luz 6 con una longitud de onda que no se utiliza para la obtención de imágenes, por ejemplo, infrarroja. Esta lámina de luz 6 puede utilizarse de forma permanente o en momentos determinados, por ejemplo, durante un experimento, a fin de comprobar la posición real del portamuestras 7, especialmente su posición real en la dirección del eje Z Z y, en su caso, corregirla durante el experimento. En lugar de una lámina de luz 6 también puede utilizarse un haz, por ejemplo, un haz gaussiano, un haz de Bessel o un haz de Mathieu. Como detector 19 puede utilizarse un diodo de cuatro cuadrantes.

En configuraciones que no forman parte de la invención, un telescopio autocolimador puede dirigirse hacia el portamuestras 7. Una posición inclinada del portamuestras 7 se convierte en un desplazamiento del reflejo BSref en el detector 19 del telescopio autocolimador. Con esta medida sólo se puede ajustar el ángulo de inclinación.

Una configuración que no forma parte de la invención condiciona un láser colimado dirigido hacia el portamuestras 7. El láser se orienta paralelamente a la perpendicular, por ejemplo, al eje de referencia B. El reflejo BSref se refleja, por ejemplo, mediante un divisor de haz o una óptica de polos y se registra en un diodo de cuatro cuadrantes. Con la ayuda de la señal del diodo de cuatro cuadrantes se puede ajustar y corregir la inclinación del portamuestras 7. Con esta configuración no es posible un ajuste de la posición real en la dirección del eje Z Z. Los dos métodos citados resultan adecuados para los sistemas de microscopios convencionales y los microscopios de lámina de luz.

En otra configuración del procedimiento también es posible llevar a cabo adicionalmente una evaluación según la calidad de imagen. Así se puede o pueden ajustar iterativamente la inclinación y/o la posición de enfoque del objetivo de detección 3, a fin de aproximar o, por ejemplo, maximizar los valores de medición de la medida de calidad de imagen elegida a los valores de medición deseados. Para ello se puede utilizar la propia muestra 5 a medir o analizar el perfil de haz de un haz de la radiación de iluminación BS elegida.

Es muy posible que el espacio de parámetros que debe comprobarse iterativamente sea demasiado grande o que el sistema no pueda optimizarse iterativamente al mínimo global, por ejemplo, una inclinación óptima del portamuestras 7 y una posición de enfoque óptima, sino que permanezca en un mínimo local. Por este motivo resulta ventajoso que el método de evaluación de la calidad de imagen se lleve a cabo en combinación con una de las configuraciones antes citadas del procedimiento. En este caso, en primer lugar, se realiza un ajuste aproximado de la inclinación del portamuestras 7 y de la posición real en la dirección del eje Z Z mediante uno de los métodos antes descritos. A continuación, se realiza un ajuste preciso por medio de una evaluación de la calidad de imagen. Este método no resulta adecuado para los sistemas de microscopios convencionales.

35 En las figuras 10 y 11 se representan esquemáticamente ejemplos de realización de disposiciones mediante las cuales es posible una detección de la topografía del portamuestras 7.

Para detectar la topografía, la topografía, que corresponde a una altura relativa del portamuestras 7 en el respectivo punto de medición Pn, se detecta en una zona del portamuestras 7 en al menos tres puntos de medición Pn. La altura relativa se registra como un valor de altura relativo. Por medio de los valores de altura relativos registrados se puede determinar la inclinación del portamuestras 7.

La topografía puede determinarse por medio de un interferómetro 21 configurado, por ejemplo, como un interferómetro de fibra. En la figura 10 se muestra de forma muy simplificada un dispositivo adecuado. En el microscopio 1 en una disposición invertida, el portamuestras 7 se encuentra en la mesa de muestras 11. Una fibra conductora de luz 21.1 del interferómetro 21 se dirige a un punto de medición Pn del lado superior OS de la base del portamuestras 7. Por medio de la fibra 21.1, una radiación se dirige o se puede dirigir a través de una superficie de salida de fibra 21.2 al punto de medición Pn. Las reflexiones que se producen en el portamuestras 7 y en la superficie de salida de fibra 21.2 se crean en las transiciones de vidrio aire y son comparables, de manera que se obtenga o se pueda obtener una señal de interferencia con una elevada profundidad de modulación.

En otras realizaciones, la fibra 21.1 puede llevarse al portamuestras 7 entre los objetivos 2, 3 o desplazarse lateralmente hacia los mismos.

Al menos uno de los puntos de medición Pn medidos puede estar situado en el campo de visión del microscopio 1 para detectar una inclinación local del cubreobjetos. El interferómetro 21 también puede posicionarse en otro punto y

el portamuestras 7 puede desplazarse a la posición de observación según la figura 10 después de la medición de la topografía por medio de la mesa de muestras 11 que se puede mover de forma accionada por motor.

Los interferómetros de fibra también pueden utilizarse en paralelo, es decir, varias fibras 21.1 se disponen y funcionan en paralelo, de manera que sea posible medir simultáneamente una zona mayor del portamuestras 7.

5 En el caso de una disposición inversa, también puede utilizarse un interferómetro clásico de campo amplio.

El método de la medición de la topografía resulta adecuado tanto para los sistemas de microscopios convencionales, como también para los microscopios de lámina de luz.

10 En otra realización posible, la topografía de la muestra 5 se determina mediante la medición de la nitidez o de otro criterio de calidad de imagen de la muestra apoyada 5 en al menos tres puntos y mediante un reajuste correspondiente de las distancias de al menos uno de los objetivos 2, 3 con respecto a la muestra 5, calculándose a partir de los mismos la inclinación local del cubreobjetos.

En otras configuraciones posibles, las nanopartículas (así llamadas fiduciales) que se apoyan en el portamuestras 7 o las marcas aplicadas al portamuestras 7 pueden actuar como muestras 5.

15 Este método, también denominado medición de nitidez, resulta adecuado tanto para los sistemas de microscopios convencionales, como también para los microscopios de lámina de luz.

Otro procedimiento de medición de la topografía se explica por medio de la figura 11, en la que se representa esquemáticamente un dispositivo para la determinación de la topografía del portamuestras mediante triangulación.

20 Para la realización de la triangulación, un punto de medición Pn se ilumina mediante radiación láser de un módulo láser 15 y se dirige al mismo desde al menos dos puntos de observación diferentes OP, es decir, desde al menos dos direcciones diferentes. Se determinan los ángulos de observación a los que se puede dirigir el respectivo punto de medición Pn desde un punto de observación determinado OP.

En la figura 11 se representan como puntos de observación OP puntos a modo de ejemplo en las respectivas superficies de detector 19.1 de los detectores 19, sobre los que se reproduce el respectivo punto de medición Pn por medio de la óptica de reproducción 9.

25 Dado que se conocen las posiciones relativas de los puntos de observación OP y se han determinado los ángulos de observación, las coordenadas de un posicionamiento real del punto de medición Pn pueden determinarse bidimensional y/o tridimensionalmente en dependencia de los puntos de observación OP y de los ángulos de observación correspondientes. En un paso posterior se determina un posicionamiento real del portamuestras 7 mediante la unidad de control 13 en dependencia del posicionamiento real de los puntos de medición Pn.

30 Para el caso representado de la medición topográfica para la determinación de la inclinación a lo largo de un eje sólo es importante la coordenada z del punto de medición Pn, por lo que es suficiente un dispositivo con un interferómetro 21 con dos puntos de medición Pn alineados en un plano perpendicularmente al plano de muestra 4. Si se pretende determinar la posición del portamuestras 7 en el espacio, son necesarios tres puntos de medición Pn.

35 Este método resulta adecuado tanto para los sistemas de microscopios convencionales, como también para los microscopios de lámina de luz.

Lista de referencias

	1	Microscopio
	2	Objetivo de iluminación
	3	Objetivo de detección
40	4	Plano de muestra
	5	Muestra
	6	Lámina de luz
60	60'	Imagen (reproducción/imagen de la sección transversal de la lámina de luz)
	60'	Imagen (de la sección transversal de la lámina de luz con el portamuestras 7' desplazado)
45	BS	Radiación de iluminación
	BSref	Parte reflejada (de la radiación de iluminación BS)
	DS	Radiación de detección
	BE	Plano de imagen
	7	Portamuestras
50	7'	Portamuestras 7 virtualmente desplazado
	8	Líquido
	9	Óptica de reproducción

ES 2 909 610 T3

	B	Eje de referencia
	10	Lente de menisco
	11	Mesa de muestras
	12	Placas de Álvarez
5	13	Unidad de control
	14	Accionamiento de objetivo
	15	Módulo láser
	16	Conformación del haz
	17	Escáner X-Y
10	18	Elemento de inmersión
	19	Detector
	19.1	Superficie de detector
	20	Objetivo de campo amplio
	21	Interferómetro
15	21.1	Fibra
	21.2	Superficie de salida de la fibra
	NA1	Apertura numérica (del objetivo de iluminación 2)
	NA2	Apertura numérica (del objetivo de detección 3)
	A1	Primer eje óptico
20	A2	Segundo eje óptico
	A3	Tercer eje óptico
	α_1	Ángulo (entre el primer y el tercer eje óptico A1, A3)
	α_2	Ángulo (entre el segundo y el tercer eje óptico A2, A3)
	d	Distancia, grosor
25	d'	Recorrido de desplazamiento
	OS	Primera superficie lateral lado superior
	US	Segunda superficie lateral lado inferior
	Pn	punto de medición n
	Ángulo β	Ángulo entre la posición real y la posición teórica
30	OP	Punto de observación
	Δy	Recorrido (en la dirección del eje Y Y)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el ajuste de un portamuestras (7) en el haz luminoso de un microscopio (1),

- 5 - en el que al menos un haz de una radiación de iluminación (BS) se dirige hacia el portamuestras (7),
- una parte de la radiación de iluminación (BSref) reflejada por el portamuestras (7) se detecta mediante un detector (19) y se determinan los valores de medición de la radiación de iluminación detectada (BSref),
- en dependencia de los valores de medición, se determina un posicionamiento real actual del portamuestras (7) con respecto al haz luminoso,
- 10 - el posicionamiento real determinado se compara con un posicionamiento teórico, y
- se generan comandos de control para la modificación del posicionamiento real, moviéndose el portamuestras (7) al posicionamiento teórico mediante la ejecución de dichos comandos,
- en el que
- se utiliza un microscopio (1) configurado como microscopio invertido (1) que comprende
- 15 - un objetivo de iluminación (2) con un primer eje óptico (A1), pasando el primer eje óptico (A1) a través de un plano de muestra (4) formado por un eje X (X) y por un eje Y (Y) ortogonal al eje X (X),
- o
- un objetivo de iluminación (2) configurado para la generación de una lámina de luz (6) mediante la radiación de iluminación (BS) con un primer eje óptico (A1), generándose o pudiéndose generar la lámina de luz (6) al menos
- 20 - parcialmente en un plano de muestra (4) formado por un eje X (X) y por un eje Y (Y) ortogonal al eje X (X),
- y un objetivo de detección (3), configurado para la detección de la luz procedente del plano de muestra (4), con un segundo eje óptico (A2),
- en el que
- el objetivo de iluminación (2) y el objetivo de detección (3) se alinean entre sí y con respecto al plano de muestra (4), de manera que el primer eje óptico (A1) y el segundo eje óptico (A2) se crucen en el plano de muestra (4)
- 25 - y formen entre sí un ángulo fundamentalmente recto, y
- formando el primer eje óptico (A1) y el segundo eje óptico (A2) respectivamente un ángulo distinto de cero con un tercer eje (A3) que está dirigido ortogonalmente al plano de muestra (4) en la dirección de un eje Z (Z) y que sirve de eje de referencia (B), y dirigiéndose el haz de la radiación de iluminación (BS) a través del
- 30 - objetivo de iluminación (2) hacia el portamuestras (7) y pasando la parte reflejada de la radiación de iluminación (BSref) a través del objetivo de detección (3) hacia el detector (19);
- y
- en un paso 1
- 35 - desplazándose el portamuestras (7), que presenta una base transparente a la radiación luminosa (BS) con una primera superficie lateral (OS) y con una segunda superficie lateral (US), en la dirección del eje Z (Z) hasta que se detecta la parte de la radiación de iluminación (BSref) reflejada por la primera superficie lateral (OS) de la base y se modifica la posición relativa del portamuestras (7) y del detector (19) una respecto a otra, de manera que una posición real de la parte detectada (BSref) se aproxime a una posición teórica en el detector (19),
- 40 - en un paso 2
- comprobándose la presencia de una inclinación de la primera superficie lateral (OS) de la base alrededor del eje Y (Y) y determinándose una desviación angular de la posición real con respecto a la posición teórica,
- 45 - girándose, en caso de comprobarse una desviación angular superior a una desviación angular admisible, el portamuestras (7) alrededor del eje Y (Y) hasta que se minimiza la desviación angular, y
- comprobándose una existencia de una desviación de la posición teórica con respecto a la posición real en la
- 50 - dirección del eje Z (Z) y repitiéndose el primer paso 1 si se produce una desviación inadmisibile.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la radiación de iluminación (BS) es una radiación con haces autorreconstruibles.

5 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la radiación de iluminación (BS) se dirige al portamuestras (7) en forma de un haz de Bessel, de un haz de Bessel coherente, de un haz de Bessel seccionado, de un haz de Sinc³, de un haz de Airy o de un haz de Mathieu.

10 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la lámina de luz (6) se genera con una radiación de iluminación (BS) de una longitud de onda diferente de la longitud de onda de una radiación de iluminación (BS) utilizada para la obtención de imágenes.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en un paso 3

15 - se comprueba una orientación de la primera superficie lateral (OS) en la dirección del eje Y (Y), desplazándose el portamuestras (7) en la dirección del eje Y (Y) y detectándose una desviación de la dirección del eje Y (Y) mediante una desaparición de la parte reflejada detectada (BSref) en el detector (19) y

20 - si se produce la desaparición, el portamuestras (7) se gira alrededor del eje X (X) hasta que ya no se produce la desaparición.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que

25 - el portamuestras ajustado (7) se desplaza en la dirección del eje Z (Z) alrededor de un recorrido de desplazamiento (d') desde una posición real, en la que una parte (BSref) reflejada por la primera superficie lateral (OS) o por la segunda superficie lateral (US) es detectada en una posición teórica por el detector (19), hasta que una parte reflejada (BSref) de la otra superficie lateral respectiva (OS, US) es detectada en la posición teórica, y por que

30 - en dependencia del recorrido de desplazamiento (d') realizado en la dirección del eje Z (Z) se determina una distancia (d) en la dirección del eje Z (Z) entre la primera y la segunda superficie lateral (OS, US).

7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que

35 - se detecta al menos un punto de medición (Pn) a partir de al menos dos puntos de observación (OP) distintos uno de otro,

- se determina el respectivo ángulo de observación en el que se encuentra el punto de medición observado (Pn) desde el respectivo punto de observación (OP),

40 - se determina un posicionamiento real del punto de medición (Pn) en dependencia de los puntos de observación (OP) y de los ángulos de observación correspondientes, y

45 - en dependencia del posicionamiento real del al menos un punto de medición (Pn), se determina el posicionamiento real del portamuestras (7).

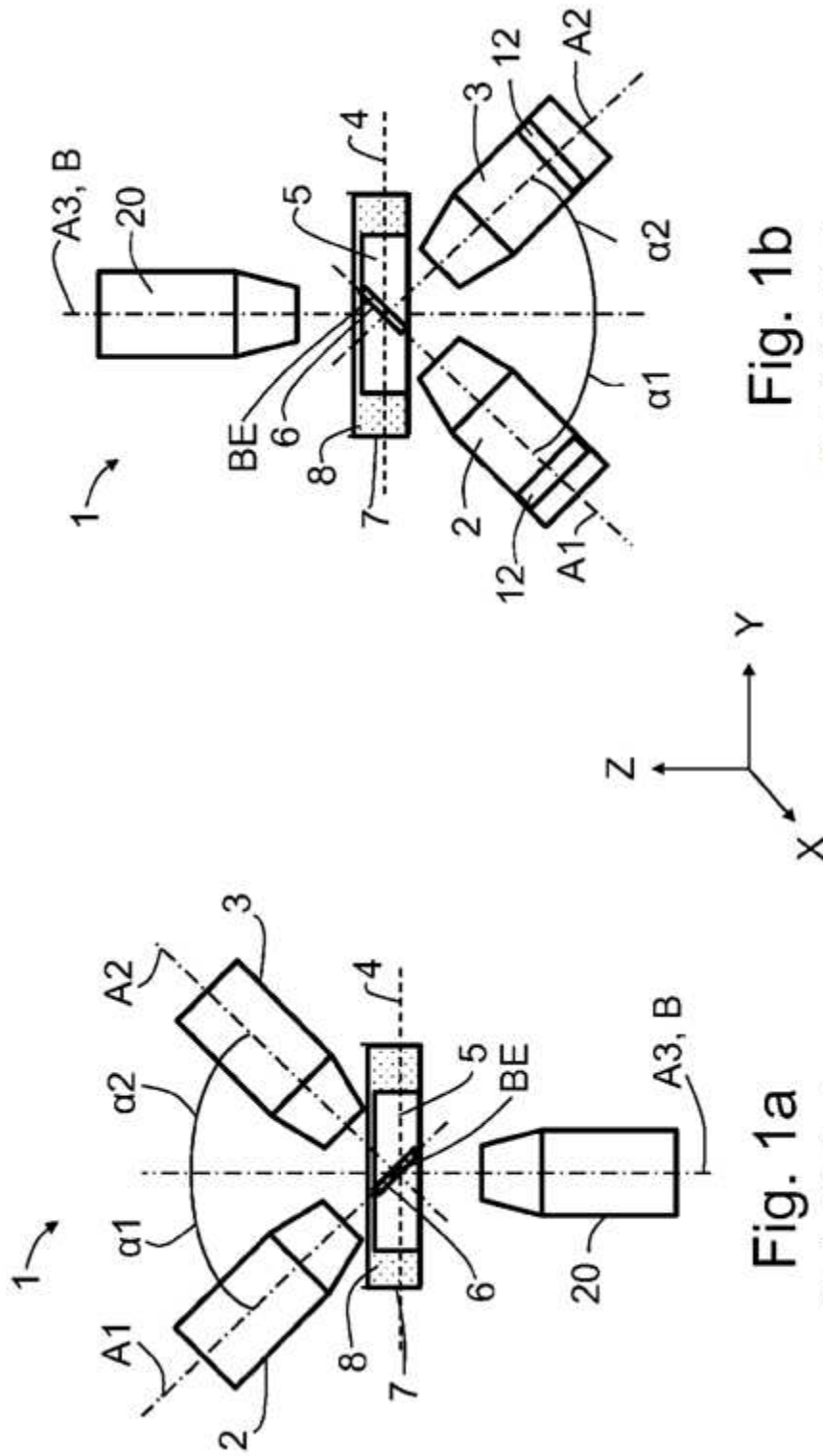


Fig. 1b

Estado de la técnica

Fig. 1a

Estado de la técnica

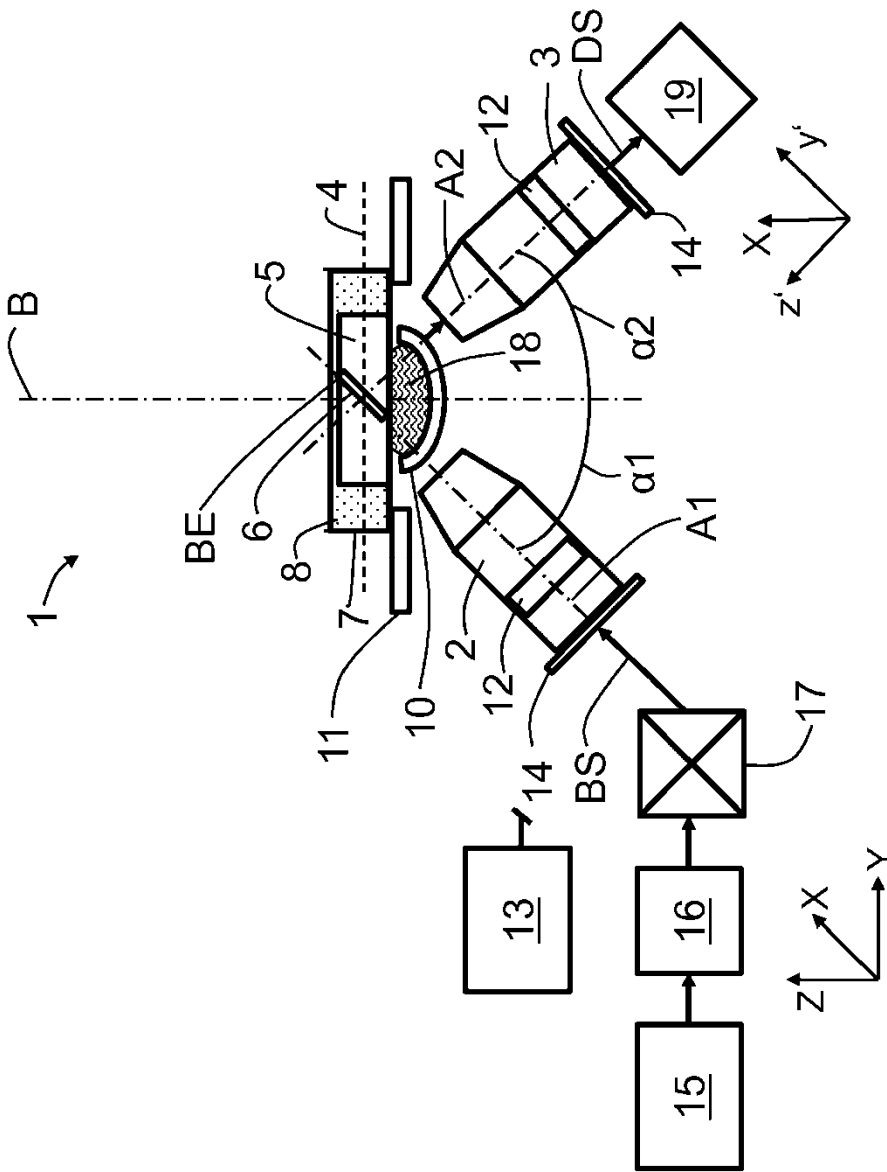


Fig. 2

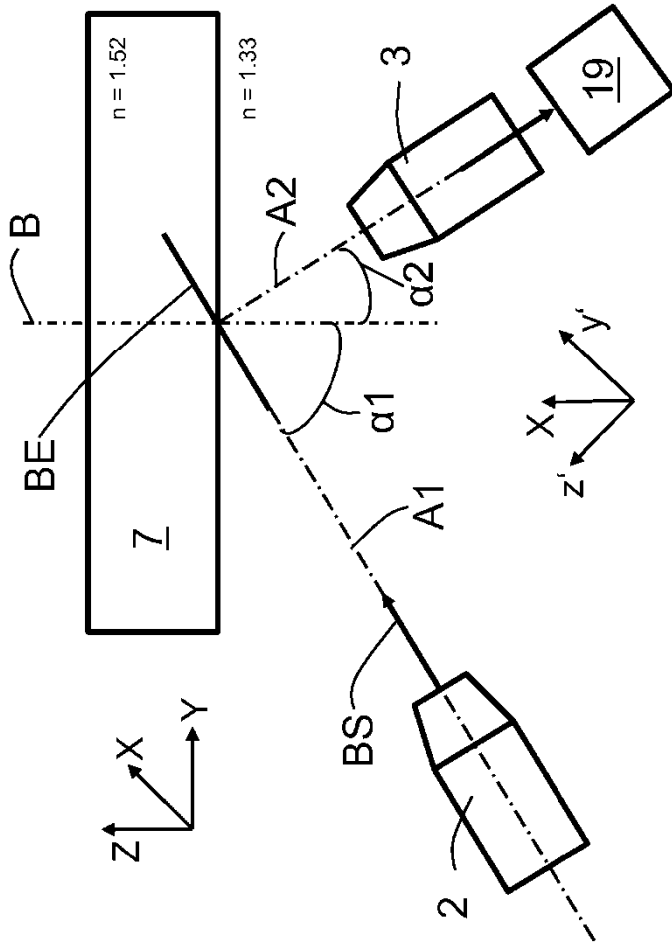


Fig. 3

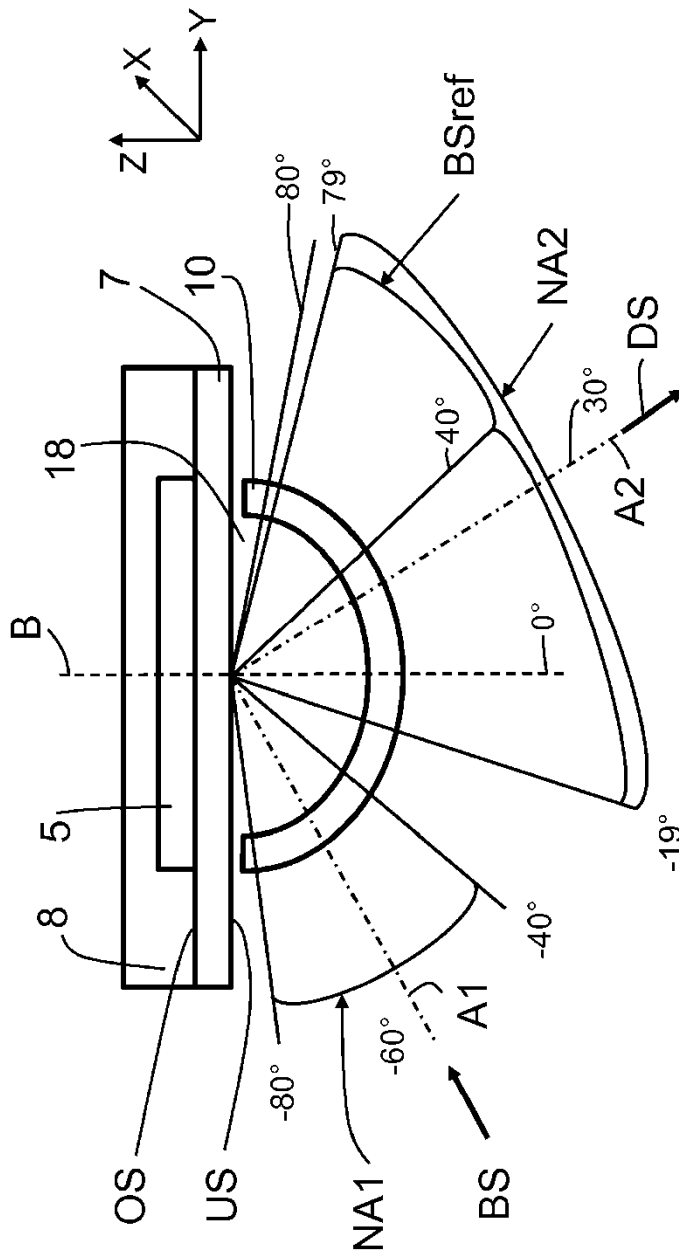


Fig. 4

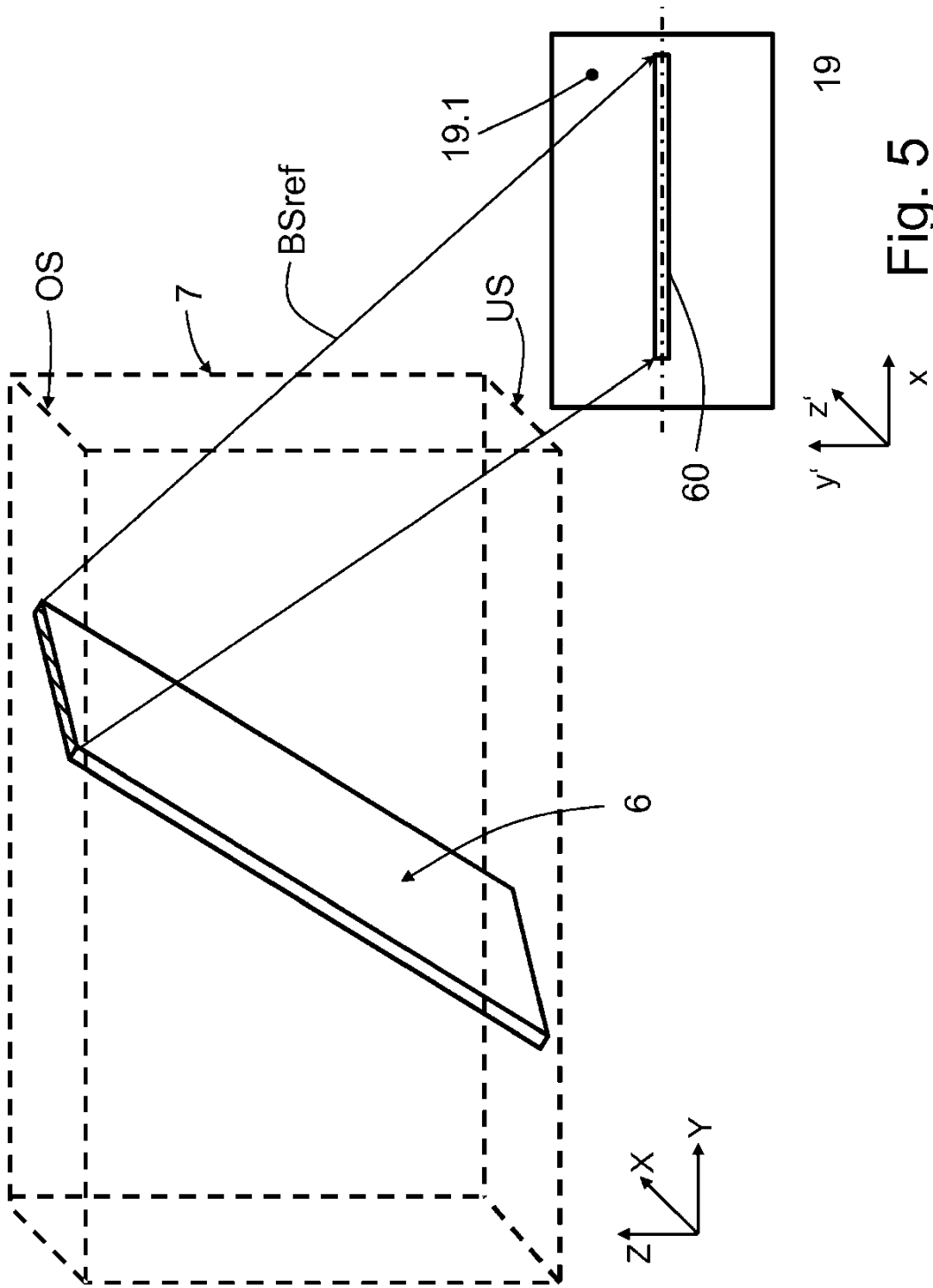


Fig. 5

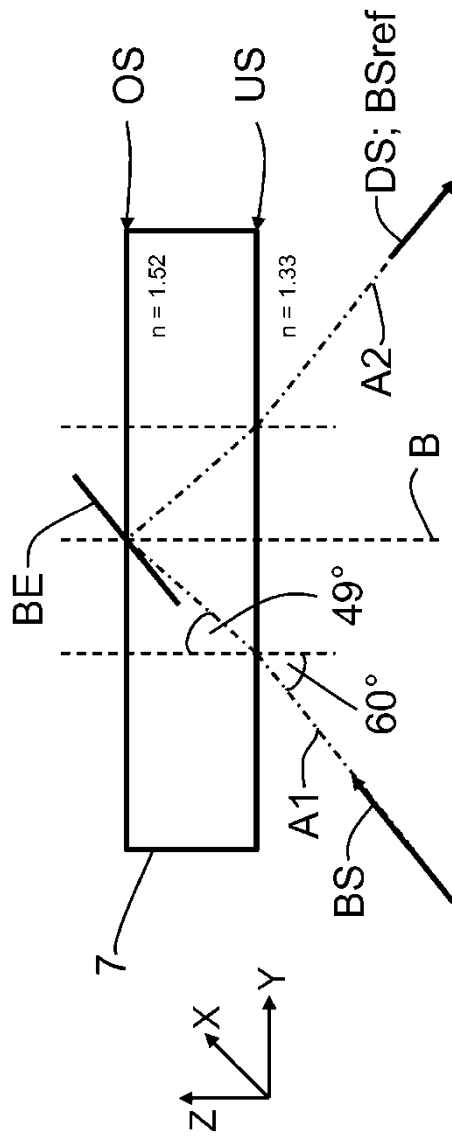


Fig. 6

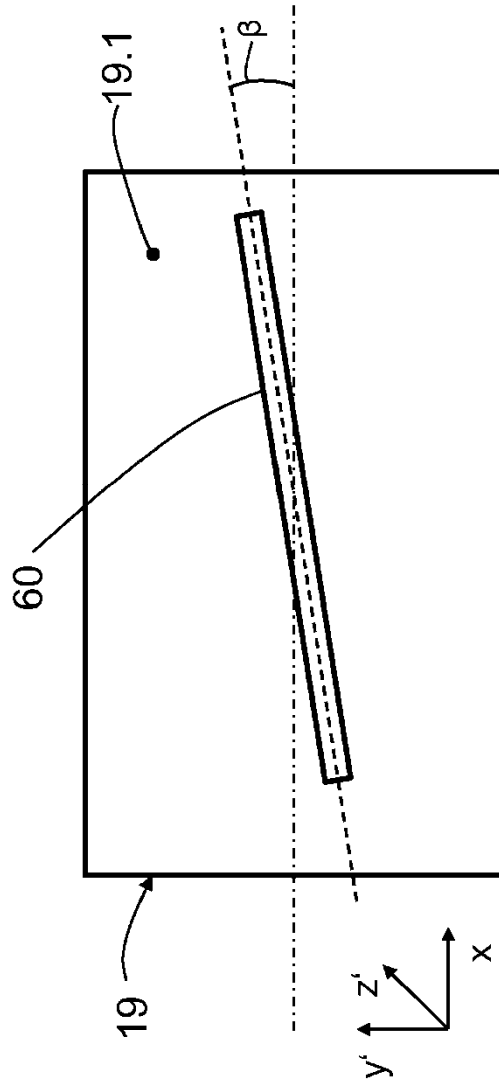


Fig. 7

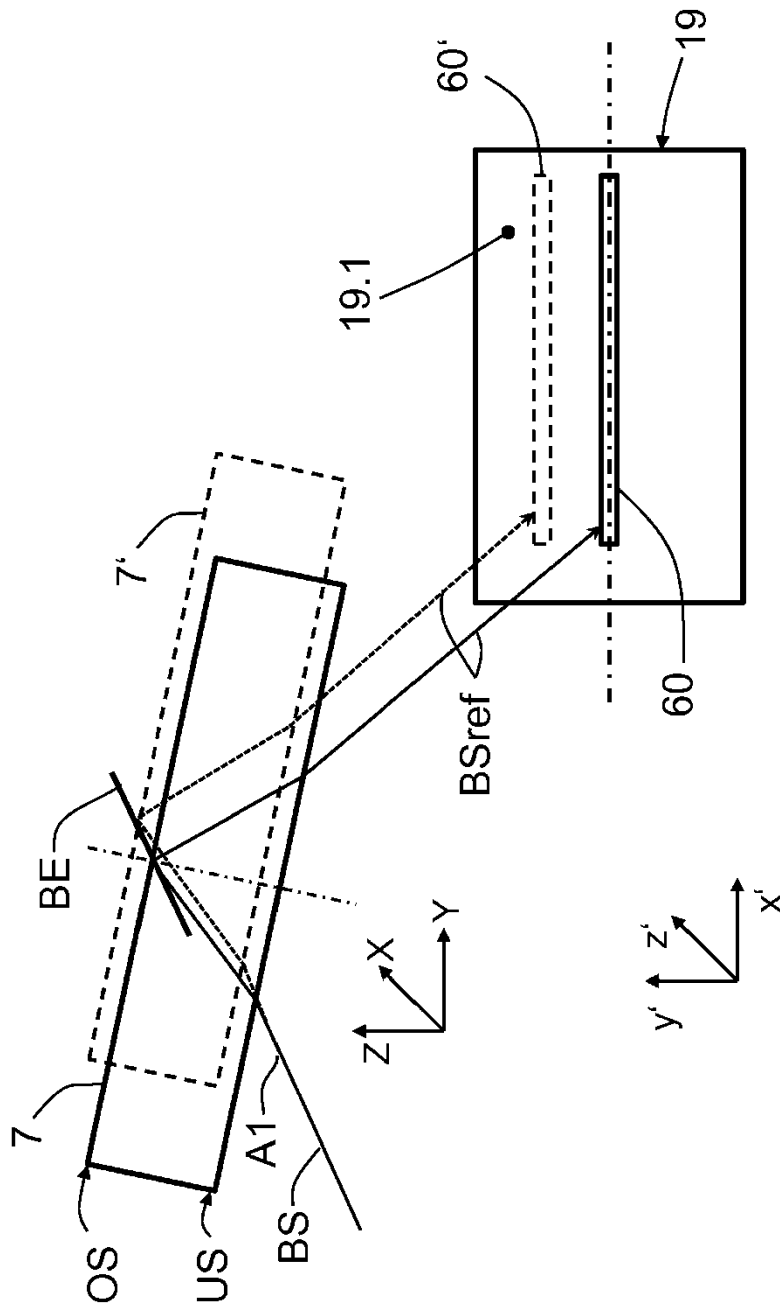


Fig. 8

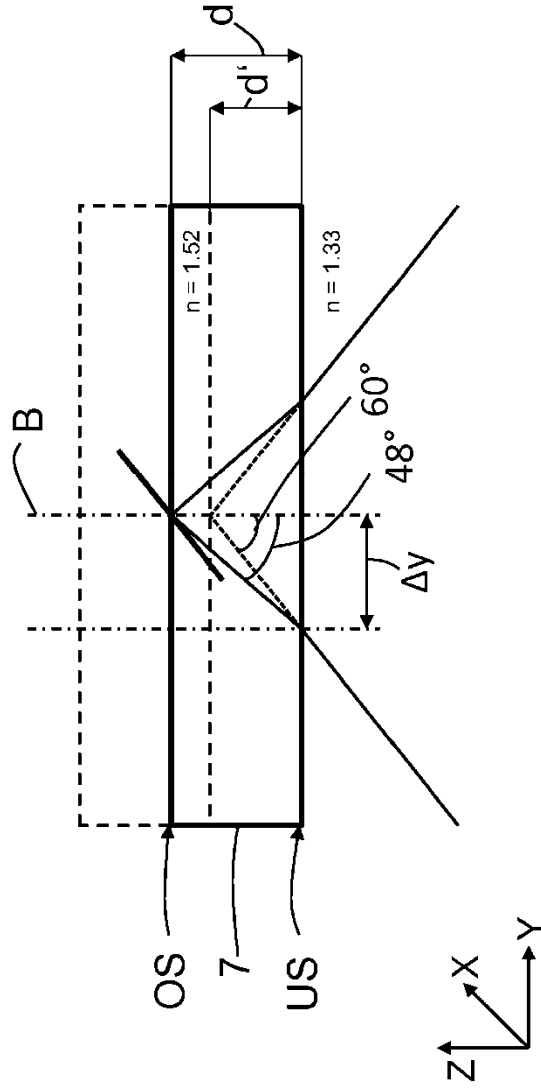


Fig. 9

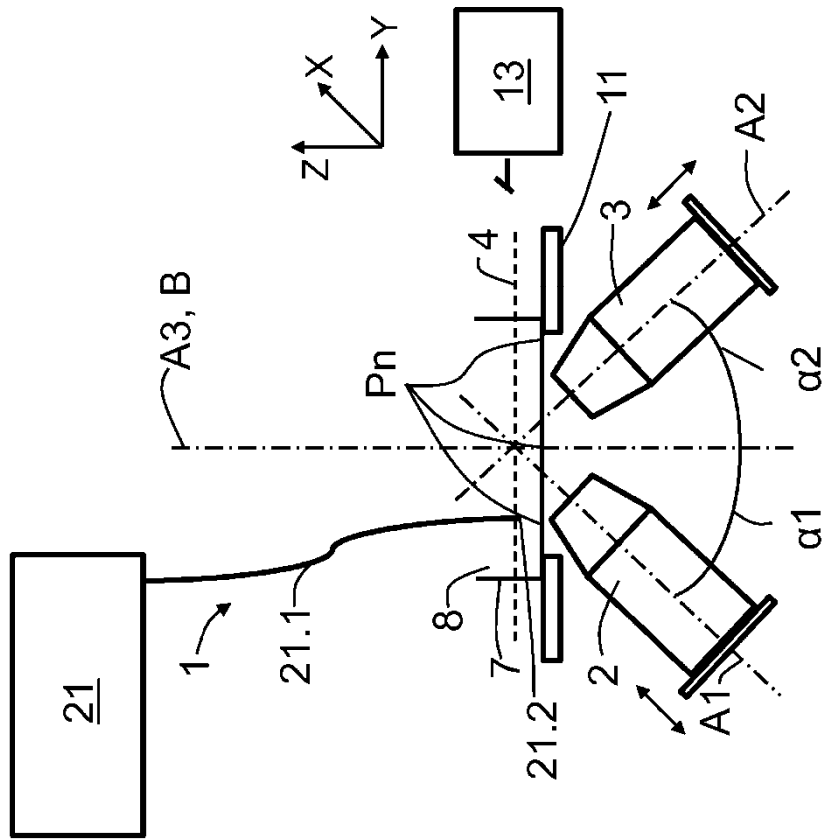


Fig. 10

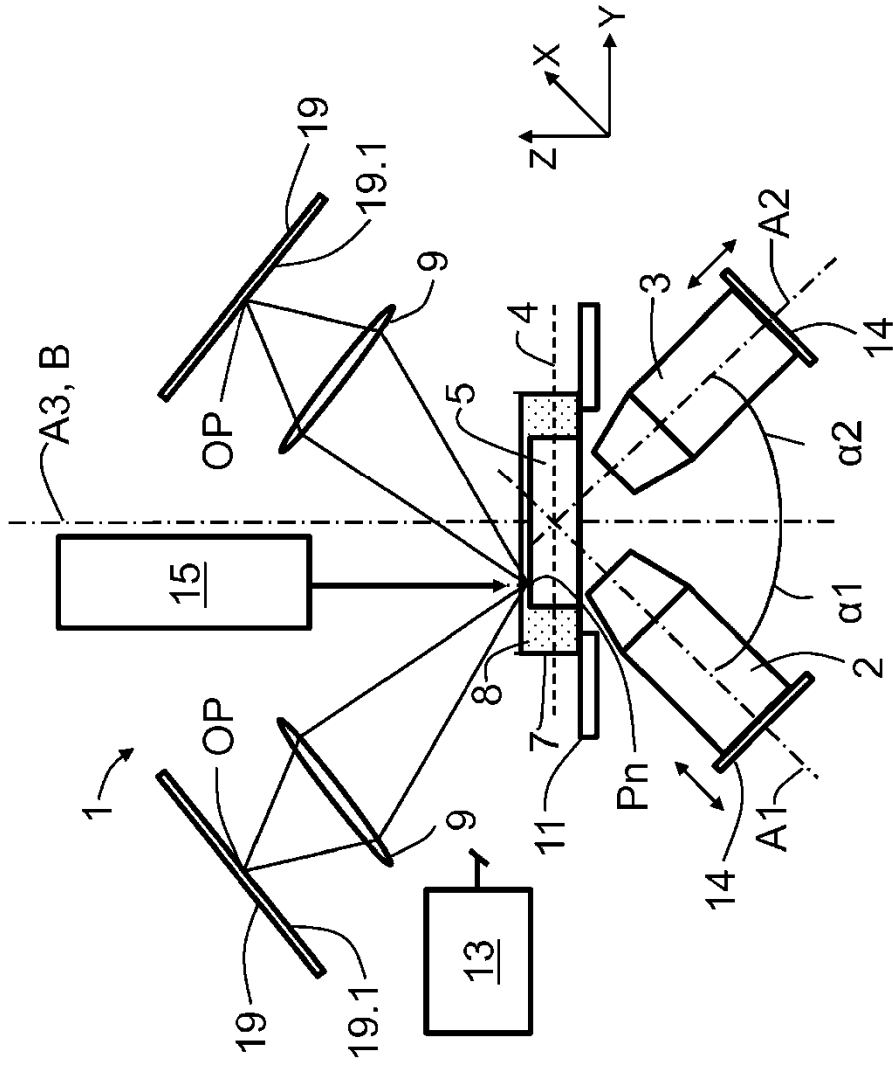


Fig. 11