

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 375**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)
G03H 1/06 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G03H 1/08 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G03H 1/04 (2006.01)
G03H 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2010** **PCT/US2010/053225**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011** **WO2011049965**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2010** **E 10825529 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 2491366**

54 Título: **Holografía y microscopia celular incoherente sin lente en un chip**

30 Prioridad:

20.10.2009 US 253276 P
05.05.2010 US 331500 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

72 Inventor/es:

OZCAN, AYDOGAN;
ISIKMAN, SERHAN OMER y
OZTOPRAK, CHETIN

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

ES 2 623 375 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

Holografía y microscopía celular incoherente sin lente en un chip

5 Campo de la invención

El campo de la invención se refiere de forma general a sistemas y a métodos de obtención de imágenes, y más particularmente a sistemas de obtención de imágenes que tienen una aplicación en particular en la obtención de imágenes y el análisis de partículas pequeñas tales como células, orgánulos, partículas celulares, y similares.

10

Antecedentes

Durante décadas, la microscopía óptica ha sido el caballo de batalla de diversos campos que incluyen la ingeniería, las ciencias físicas, la medicina y la biología. A pesar de su larga historia, hasta hace relativamente poco no se ha producido ningún cambio significativo en el diseño de los principios de trabajo de los microscopios ópticos. A lo largo de la última década, motivadas parcialmente por la misión de comprender mejor el ámbito del nano-mundo, comenzaron a renacer técnicas de súper-resolución para la microscopía óptica mediante el abordaje de algunas de las limitaciones fundamentales de la obtención de imágenes ópticas, tales como el límite de difracción. Además de estas técnicas de súper-resolución, también se han implementado otras diversas nuevas arquitecturas de imagen para mejorar el estado de la técnica en la microscopía óptica para conseguir una velocidad, una proporción entre señal y ruido (SNR), un contraste, un rendimiento, una especificidad, etc., mejores. Este reciente progreso en la microscopía utilizó varias técnicas innovadoras para superar las barreras fundamentales en la obtención de imágenes y ha creado una significativa excitación en un conjunto diverso de campos al permitir la realización de nuevos descubrimientos.

25

Sin embargo, junto con este progreso, ha aumentado la complejidad global y el coste de las plataformas de obtención de imágenes ópticas. Los caros y a menudo grandes sistemas de obtención de imágenes ópticas a menudo limitan el amplio uso de algunas de estas modalidades de imágenes ópticas avanzadas más allá de los laboratorios bien equipados.

30

Mientras tanto se ha producido un rápido avance en las tecnologías digitales, con matrices de detectores en estado sólido bidimensionales mucho más baratas que tienen unas áreas mayores con unos píxeles más pequeños, unos mejores rangos dinámicos, velocidades de los fotogramas y proporciones entre señal y ruido, así como unos procesadores y unas memorias digitales mucho más rápidos, baratos y potentes. Esta revolución digital en proceso, cuando se combina con las teorías avanzadas de imagen y los algoritmos numéricos, también crean una oportunidad para que la obtención de imágenes ópticas y la microscopía puedan enfrentarse a otra dimensión en este renacimiento hacia una simplificación de los aparatos de obtención de imágenes ópticas, haciéndolos más significativamente compactos, rentables y fáciles de usar, potencialmente sin sacrificar su rendimiento.

40 Durante décadas, las lentes han ayudado a los detectores (analógicos o digitales) a operar con el menor producto de espacio-ancho de banda posible, que está determinado por el campo visual y la resolución de imagen deseados. Sin embargo, la revolución digital analizada anteriormente ya ha avanzado el estado de la técnica para los generadores de imágenes digitales, de forma que actualmente ya hay disponible un producto espacio-ancho de banda bidimensional $> 10\text{-}20$ millones. Esto implica que las matrices detectoras de hoy en día son mucho más adecuadas
45 ahora para manejar la información de distorsión causada por la difracción, que después puede originar cuestiones sobre la necesidad absoluta del uso de lentes en la obtención de imágenes ópticas. Además, los procesadores digitales actuales, junto con los nuevos algoritmos, también están mucho más preparados para procesar, prácticamente de forma instantánea, la información adquirida en el extremo del detector para realizar el trabajo de una lente física. Mirando esta imagen se puede concluir que el amplio uso de las lentes (o de elementos de moldeado del frente de onda similares) en la obtención de imágenes ópticas puede ahora ser potencialmente sustituido para
50 diversas necesidades de aplicación (específicamente para la microscopía celular) por arquitecturas ópticas rentables, compactas y mucho más simples que compensan, en el ámbito digital, la ausencia de complejidad de los componentes ópticos. Esta estrategia debería abordar especialmente las necesidades y los requisitos de los ajustes de recursos limitados, proporcionando potencialmente un gran salto en la lucha contra varios de los problemas
55 globales relacionados con la salud que implican enfermedades infecciosas.

De forma bastante importante, la microscopía en los entornos con unos recursos limitados tiene unos requisitos considerablemente diferentes a los de los laboratorios avanzados, y dichos dispositivos de obtención de imágenes deberían ser simples de usar y de manejar, rentables, compactos y de peso ligero, mientras que al mismo tiempo

sean apropiadamente precisos. Otro campo que se beneficiaría enormemente de los dispositivos de obtención de imágenes digitales sin lente, compactos y rentables con chip digital es el campo de los microfluidos. A lo largo de la última década, los microfluidos han revolucionado el conjunto de herramientas disponible para manipular las células al reducir significativamente el dispositivo y los volúmenes de reactivo requeridos, así como los costes asociados. En algunos casos, esto ha permitido las denominadas aplicaciones de *lab-on-a-chip*. A pesar de todo el progreso que se ha producido en las tecnologías ópticas emergentes con los microfluidos, un área que todavía permanece con un rendimiento relativamente bajo, voluminoso y costoso es la integración de las plataformas de microscopía óptica con las características microfluidas que se encuentran en dichos dispositivos. Sin una miniaturización y una simplificación significativas de esta plataforma de obtención de imágenes, junto con un aumento en el rendimiento, la verdadera magnitud de la revolución microfluida no puede hacerse totalmente realidad, especialmente para aplicaciones de citometría.

El fruto de este pensamiento ya ha aparecido en la bibliografía, en la que se han demostrado con éxito varias arquitecturas de obtención de imágenes sin lente sobre chip. Véase, por ejemplo, Xu, W., Jericho, M. H., Meinertzhagen, L.A. & Kruezer, H. J. Digital in-line holography for biological applications. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98, 11301-11305 (2001). Entre estas estrategias, la holografía digital sin lente merece una atención especial ya que con los nuevos algoritmos computacionales y modelos matemáticos, tiene el potencial de aprovechar al máximo esta revolución digital. En este contexto, la holografía en línea digital sin lente ya se ha demostrado con éxito para la microscopía de alta resolución de células y de otros microorganismos, según se describe en Xu et al., anterior. Las estrategias holográficas en línea coherentes sin lente convencionales, demandan sin embargo una coherencia espacial casi perfecta para la iluminación, y por lo tanto requieren el enfoque de una luz láser sobre una pequeña apertura que esta dimensionada en el orden de una longitud de onda para el filtrado espacial. El uso de un tamaño de apertura menor (por ejemplo, de 1-2 μm) requiere un sistema mecánicamente estable y cuidadosamente alineado junto con una lente de enfoque para acoplar eficazmente la radiación láser a la apertura para un mejor rendimiento de la luz. Esto puede requerir un sistema robusto para asegurar una alineación óptica y una estabilidad mecánica apropiadas. Además, el mantenimiento de dicha pequeña apertura limpia y operativa durante un periodo prolongado de tiempo puede ser otro reto, especialmente para usos fuera del entorno de laboratorio.

Además, en la holografía en línea convencional sin lente, las células de interés normalmente están ubicadas lejos (por ejemplo, > 1-2 cm) de la superficie del sensor, de forma que la firma holográfica de cada célula está diseminada sustancialmente en la totalidad del área del sensor, donde todas las "firmas" holográficas particulares de las células solapan significativamente. Dicha estrategia limita desafortunadamente el campo visual de la obtención de imágenes (FOV) al plano de la célula. Todos estos requisitos aumentan el coste y el tamaño del instrumento óptico. Además, estas limitaciones también hacen que las estrategias de holografía en línea coherente sin lente convencionales no sean convenientes para su uso en entornos con recursos limitados, tal como en el campo.

Las fuentes incoherentes o parcialmente coherentes en holografía también se han utilizado en diferentes arquitecturas ópticas basadas en lentes. Estas técnicas de obtención de imágenes holográficas no están clasificadas, sin embargo, como "en chip", ya que utilizan diversos componentes ópticos voluminosos y por lo tanto pueden considerarse dentro de la misma categoría que las modalidades de obtención de imágenes avanzadas analizadas anteriormente, lo que las hace mucho menos adecuadas para usos fuera de laboratorio. Recientemente se han demostrado unas estrategias mucho más simples mediante el uso de una holografía en línea parcialmente coherente sin lente para la obtención de imágenes de partículas de látex, pero estas técnicas también adolecen de un pequeño campo visual, ya que posicionan los sujetos de interés lejos de la superficie del sensor. Véase, por ejemplo, Dubois, F., Requena, M. N., Minetti, C., Monnom, O. & Istasse, E. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source. Appl. Opt. 43, 1131-1139 (2004). Además, estos estudios usaron una óptica de acoplamiento para la iluminación, tal como un objetivo-lente de microscopio, y tenían un rendimiento en la obtención de imágenes relativamente grosero.

El documento US 2004/0165788 A1 desvela un sistema de obtención de imágenes semiconductor que incluye un sensor que tiene uno o más receptores y un medio para la transferencia de la imagen a la escala del sensor y de los receptores.

El documento WO 2008/090330 A1 desvela un aparato y un método para la detección de células biológicas. La muestra se mantiene en la trayectoria de transmisión de la luz procedente de una fuente luminosa hacia un detector, mediante lo cual la luz interactúa con los objetos de la muestra.

Ryle et al. (Digital In-line holography of biological specimens, Proc. of SPIE, Vol. 6311, 63110C, 2006) desvela un método para la reconstrucción de una imagen tridimensional que contiene información sobre la amplitud y la fase a

partir de un patrón de interferencia bidimensional registrado con un sensor.

Resumen

- 5 La presente invención está definida por las características de las reivindicaciones independientes anexas 1 y 11.

La plataforma y el método permiten una resolución subcelular en un amplio campo visual sin la necesidad de ninguna lente (aunque podrían incorporarse lentes), de fuentes coherentes tales como láseres ni de ningún otro componente óptico voluminoso. Con este sistema sin lente, se pueden registrar hologramas de fase y amplitud
10 individuales de diversos tipos celulares para el posterior reconocimiento digital y recuento automatizado de cada tipo celular basado en sus firmas holográficas en 2D. Además, el sistema y el método permiten una reconstrucción precisa de las imágenes microscópicas presentando una resolución subcelular en un amplio campo visual incluso a unas densidades celulares de hasta aproximadamente 0,4 millones de células/ μ l. Debido a que esta plataforma utiliza unos componentes ópticos simples, compactos, de peso ligero y rentables, que son tolerantes a los errores de
15 alineación, también puede proporcionar una herramienta importante para aplicaciones de biología celular, de microfluidos y de citometría basadas en telemedicina en entornos con pocos recursos. Por ejemplo, la plataforma puede ser integrada en un dispositivo relativamente pequeño que puede usarse para el diagnóstico y la investigación de diversas enfermedades infecciosas tales como la malaria, el VIH y la tuberculosis. El dispositivo también puede ser capaz de cribar el agua para buscar los parásitos causantes de enfermedades o de otras enfermedades
20 infecciosas.

En este sentido, se ha demostrado el rendimiento de la plataforma de holografía celular incoherente sin lente en el recuento automatizado y la obtención de imágenes microscópicas de células sanguíneas completas con una resolución espacial suficiente para diferenciar los granulocitos, los monocitos y los linfocitos entre sí, con unas
25 etapas de preparación de la muestra mínimas.

Existen diversos aspectos de esta plataforma de holografía celular incoherente sin lente que hacen que sea muy ventajosa para la biología celular en sistemas microfluidos y para aplicaciones de citometría. En primer lugar, no es necesario que la fuente luminosa de esta estrategia holográfica sea un láser. Más bien, puede usarse una fuente
30 completamente incoherente sin la necesidad de ninguna lente ni de ningún otro componente óptico voluminoso. Esta característica simplifica en gran medida el conjunto óptico, haciéndolo rentable y compacto, así como eliminando los efectos del ruido de partículas coherente y de la interferencia de la reflexión múltiple inducida por el sustrato en los hologramas celulares. El segundo lugar, la estrategia de holografía celular incoherente sin lente no requiere un tamaño de apertura pequeño para la iluminación, y por lo tanto mejora el rendimiento luminoso del sistema de
35 obtención de imágenes en órdenes de magnitud sin provocar problemas en el análisis del patrón del holograma celular ni en la reconstrucción de la imagen digital. El gran tamaño de apertura (por ejemplo, de 50-100 μ m) también elimina el uso de una óptica de acoplamiento/enfoque entre la frente y los planos de apertura, al contrario que la mayoría de las estrategias de holografía convencionales. Esta estrategia lo hace robusto frente a errores de alineación mecánicos o potenciales problemas de obstrucción. Esto permite unos largos tiempos de funcionamiento
40 sin artefactos en las imágenes y la necesidad de realineaciones, haciéndolo muy adecuado para su uso en el campo. En tercer lugar, debido a que las células de interés están colocadas mucho más cerca de la matriz del sensor que de la fuente luminosa (con un aumento marginal de ~ 1), se pueden obtener imágenes con un campo visual mucho mayor, normalmente > 10 veces que con un microscopio óptico, o $> 50-100$ veces que con un microscopio holográfico en línea sin lente convencional.

45 Esta propiedad también permite la detección simultánea sobre el chip de señales fluorescentes sobre un amplio campo visual sin la necesidad de ninguna lente ni de caros filtros fluorescentes de película fina, lo que es muy importante para crear una plataforma de obtención de imágenes sobre chip híbrida que sea capaz de combinar la microscopía holográfica incoherente con la detección fluorescente, para aumentar la especificidad y la funcionalidad
50 de la plataforma de obtención de imágenes sin lente. Finalmente, aparte de la reconstrucción de las imágenes microscópicas de las células a través del procesamiento holográfico de la fase óptica integrada, el sistema también puede detectar una textura holográfica bidimensional única (es decir, una huella) correspondiente a cada célula, que proporciona una fuente alternativa de información que complementa las imágenes celulares reconstruidas. A través del análisis del patrón y/o de la textura de dichas firmas celulares holográficas (tanto de la fase como de la amplitud)
55 es posible reconocer el tipo y el estado de cada célula de interés (sin ninguna reconstrucción digital), lo que es especialmente importante para las aplicaciones de citometría. Por ejemplo, las firmas del holograma observadas pueden permitir decisiones diagnósticas muy rápidas (por ejemplo, la comparación de las firmas del holograma de las células sanas frente a las enfermas). El sistema de obtención de imágenes holográfico sin lente y el método descrito en el presente documento pueden combinarse con una electrónica digital para proporcionar una solución

transformadora para algunas de las necesidades no satisfechas de la biología celular, la citometría y el diagnóstico médico, especialmente para entornos con recursos limitados.

- En un aspecto de la invención, el sistema puede incluir adicionalmente un prisma interpuesto entre el filtro espacial y el soporte de la muestra y una fuente de iluminación fluorescente configurada para iluminar la muestra citológica a través del prisma, en el que sustancialmente toda la iluminación fluorescente incidente es reflejada a través de una reflexión interna total (TIR). La iluminación fluorescente incidente puede proceder de un lateral o estar en ángulo, mientras que la fuente de iluminación holográfica está dirigida de arriba a abajo. Las emisiones fluorescentes de una o más especies de la muestra pueden ser detectadas por la matriz del sensor de imágenes.

10 Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 es una representación esquemática de un sistema de microscopía y holografía celular incoherente sin lente según una realización.
- 15 La FIG. 2 es una representación esquemática de los componentes del sistema de microscopía y holografía celular incoherente sin lente según una realización.
- La FIG. 3 es una vista en despiece parcial de un dispositivo de comunicación móvil que tiene integrada en el mismo una funcionalidad de holografía celular incoherente sin lente.
- La FIG. 4 ilustra una representación esquemática del algoritmo de de-Bayerling desarrollado para la creación de imágenes holográficas monocromáticas a partir del producto con un patrón de Bayer del sistema.
- 20 La FIG. 5 ilustra otra realización del sistema de microscopía y holografía celular incoherente sin lente que incluye una funcionalidad de obtención de imágenes fluorescentes.
- Las FIGS. 6(a) - 6(k) ilustran una obtención de imágenes holográfica y fluorescente sin lente del mismo campo visual que se obtienen secuencialmente para una solución heterogénea que contiene microesferas fluorescentes y no fluorescentes.
- 25 La FIG. 7 ilustra imágenes fluorescentes en chip sin lente de *C. elegans* transgénico.
- La FIG. 8 ilustra imágenes fluorescentes en chip sin lente de *C. elegans* transgénico mediante el uso de una matriz del sensor de imágenes diferente.
- La FIG. 9 ilustra otra realización del sistema de microscopía y holografía celular incoherente sin lente que incluye una funcionalidad de obtención de imágenes fluorescentes.
- 30 La FIG. 10A ilustra una realización del sistema de microscopía y holografía celular incoherente sin lente que incluye una funcionalidad de obtención de imágenes fluorescentes junto con el uso de una placa frontal óptica.
- La FIG. 10B ilustra una imagen de microscopía de la placa frontal óptica.
- La FIG. 11 ilustra un diagrama de flujo de nivel superior sobre cómo los sistemas reconstruyen digitalmente una imagen del objeto de interés.
- 35 La FIG. 12 ilustra los resultados de la obtención incoherente de imágenes sin lente de una muestra de un frotis de sangre, que ilustra las firmas holográficas de los tres principales tipos de glóbulos blancos sanguíneos (es decir, granulocitos, linfocitos y monocitos).
- La FIG. 13A ilustra una gráfica que compara la precisión de un recuento manual con el microscopio de células con el recuento holográfico automático.
- 40 La FIG. 13B ilustra el holograma en bruto y la reconstrucción de las imágenes de diversas densidades de células junto con la vista del objetivo del microscopio a 10x.
- La FIG. 14 ilustra imágenes de glóbulos rojos sanguíneos a una densidad de 0,4 millones de células/μl. La imagen superior izquierda es el plano del holograma en bruto donde solapan todos los hologramas celulares. La imagen superior derecha muestra las imágenes celulares reconstruidas. Las imágenes inferiores ilustran la fase aislada y las firmas holográficas de la amplitud de los tres glóbulos rojos seleccionados que se muestran en el interior de círculos en la imagen superior derecha.

Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

- 50 La FIG. 1 ilustra un sistema 10 para la obtención de imágenes de una muestra citológica 12 según una realización. El sistema incluye un soporte de muestras 14 que está configurado para dar soporte a una muestra citológica 12. El soporte de muestras 14 puede incluir un portaobjetos de vidrio o de plástico (con o sin un cubreobjetos), un recipiente, una cubeta o similares. El soporte de muestras 14 está hecho preferentemente de un material ópticamente transparente al menos a las longitudes de onda de luz a las que opera el sistema 10. La muestra citológica 12 contiene elementos biológicos de los que se van a obtener imágenes, a saber, células o elementos celulares. La muestra 12 puede incluir sangre, sudor, esputo, mucus, o incluso muestras medioambientales (por ejemplo, agua de un lago o de una corriente). La muestra citológica 12 puede ser una muestra preparada o puede ser una muestra biológica directa que se ha colocado sobre el soporte de muestras 14 sin ninguna preparación. Por

ejemplo, en el caso de glóbulos rojos sanguíneos como muestra, puede diluirse una muestra sanguínea con solución salina tamponada con fosfato 1 x (PBS) o solución salina de banco de sangre (por ejemplo, Fisherbrand, Blood Bank Saline, Fisher Scientific).

- 5 El soporte de muestras 14 está posicionado por encima de una matriz del sensor de imágenes 16. Es decir, la matriz del sensor de imágenes 16 está ubicada adyacente a la parte posterior del soporte de muestras 14. La superficie de la matriz del sensor de imágenes 16 puede estar en contacto o en estrecha proximidad con la parte posterior del soporte de muestras 14. La matriz del sensor de imágenes 16 puede comprender, por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (CCD) o un semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS). La matriz del sensor de imágenes 16 puede ser monocromática o en color. La matriz del sensor de imágenes 16 tiene generalmente un tamaño de píxel pequeño, que es menor de 9,0 μm de tamaño, y más particularmente, menor de 5,0 μm de tamaño (por ejemplo, 2,2 μm o menor). Generalmente, los sensores que tengan un tamaño de píxel menor producirán mayores resoluciones. Un beneficio del método de obtención de imágenes descrito en el presente documento es que puede obtenerse una resolución espacial mejor que el tamaño de píxel.
- 15 Haciendo referencia aún a la FIG. 1 el sistema 10 incluye un filtro espacial 18 que está dispuesto lejos de la superficie superior del soporte de muestras 14. El filtro espacial 18 tiene una apertura 20 contenida en el mismo que está configurada para permitir el paso de la iluminación. La apertura 20 tiene un diámetro (D) que normalmente está en el intervalo de entre 50 μm y aproximadamente 100 μm . La FIG. 1 ilustra un plano celular 22 que representa un plano que intersecta los elementos biológicos (por ejemplo, las células) contenidos en la muestra 12. Este plano celular 22 está dispuesto generalmente sustancialmente en la superficie del soporte de muestras 14 que contiene la muestra citológica. Como se observa en la FIG. 1, el filtro espacial 18 está ubicado a una distancia z_1 del plano celular 22. El plano de obtención de imágenes de la matriz del sensor de imágenes 16 está ubicado a una distancia z_2 del plano celular 22. En el sistema 10 descrito en el presente documento, $z_2 \ll z_1$. Por ejemplo, la distancia z_1 puede ser del orden de entre aproximadamente 1 cm y aproximadamente 10 cm. En otras realizaciones, el intervalo puede ser menor, por ejemplo, de entre aproximadamente 5 cm y aproximadamente 10 cm. La distancia z_2 puede ser del orden de entre aproximadamente 0,05 mm y 2 cm, sin embargo, en otras realizaciones esta distancia z_2 puede ser de entre aproximadamente 1 mm y 2 mm.
- 30 El sistema 10 incluye una fuente de iluminación 24 como se ilustra en la FIG. 2. La fuente de iluminación 24 es preferentemente una fuente luminosa incoherente o parcialmente incoherente. Los diodos emisores de luz (LED) son un ejemplo de una fuente luminosa 24 que puede usarse como la fuente de iluminación 24. Los LED son relativamente baratos, duraderos y generalmente tienen unos bajos requisitos de potencia. Una de las ventajas significativas del sistema 10 es que el diseño permite una cierta variación en las tolerancias mecánicas, de forma que el sistema 10 aún es operativo incluso si no hay una alineación perfecta entre la fuente de iluminación 24, el filtro espacial 18 y la matriz del sensor de imágenes 16.

- La FIG. 2 ilustra el sistema 10 junto con varios componentes adicionales. En una realización, un ordenador 26, tal como un ordenador portátil, un ordenador de sobremesa o similares, está conectado operativamente con el sistema 10, de forma que las imágenes (por ejemplo, los fotogramas de las imágenes) sean transferidas desde la matriz del sensor de imágenes 16 al ordenador 26 para la adquisición de los datos y el procesamiento de las imágenes. El ordenador 26 incluye uno o más procesadores (no mostrados) que, según se describe con más detalle en el presente documento, ejecutan un programa informático que adquiere una imagen de la muestra 12 que incluye la amplitud holográfica o la intensidad. El programa informático del ordenador 26 recupera entonces la fase perdida de la imagen. Teniendo tanto la amplitud holográfica como la fase recuperada de la misma imagen, el programa informático reconstruye después una imagen de la muestra 12. Esta imagen reconstruida 12 puede ser mostrada al usuario, por ejemplo, en un monitor 28 o similares. El programa informático también puede identificar y mostrar células de interés en particular basándose en su firma holográfica. Por ejemplo, el programa informático puede estar programado para identificar los linfocitos de la muestra, ignorando los granulocitos y los monocitos. Estos linfocitos, que son identificados por su firma holográfica única, son mostrados a continuación al usuario en la pantalla 28. El programa informático también puede contar las poblaciones celulares o las subpoblaciones celulares, información que también puede ser mostrada en la pantalla 28. La firma holográfica única también puede usarse para la identificación de estados patológicos. Por ejemplo, los glóbulos rojos sanguíneos pueden ser evaluados por el programa informático para buscar un estado patológico tal como una anemia drepanocítica o una infección por malaria. Esta información puede ser devuelta al usuario a través de la pantalla 28.

En otra realización alternativa hay un dispositivo de comunicación móvil 30 conectado al sistema 10. Las imágenes (por ejemplo, los fotogramas de las imágenes) puede ser transferidas desde la matriz del sensor de imágenes 16 al dispositivo de comunicación móvil 30 para la adquisición de los datos y el procesamiento de las imágenes mediante el

uso de uno o más procesadores contenidos en el dispositivo de comunicación móvil 30. Alternativamente, el dispositivo de comunicación móvil 30 puede simplemente transferir los datos a través de una red de comunicación 32 que después son transferidos a un ordenador en remoto 34 para su procesamiento adicional. La red de comunicación 32 puede incluir, por ejemplo, una amplia red de trabajo tal como Internet, o puede incluir una red inalámbrica que es empleada para la transmisión y la recepción de datos en dispositivos de comunicación móviles convencionales 30. Los datos pueden ser devueltos al dispositivo de comunicación móvil 30 mediante el uso de la misma red de comunicación 32.

En otra realización alternativa, como se explica con más detalle a continuación, los componentes del sistema están integrados en el dispositivo de comunicación móvil 30. A saber, el dispositivo de comunicación móvil 30 incluye la matriz del sensor de imágenes 16, la fuente de iluminación 24, el filtro espacial 18, y está configurado para recibir el soporte de muestras 14 para su análisis mediante el uso del dispositivo de comunicación móvil 30. En esta realización, uno o más procesadores contenidos en el dispositivo de comunicación móvil 30 contienen el programa informático para el análisis y el procesamiento de las imágenes. Alternativamente, el dispositivo de comunicación móvil 30 puede simplemente transferir los archivos de imagen en bruto a través de una red de comunicación 32 donde se usa un ordenador en remoto 34 para el procesamiento y el análisis de las imágenes. Después, los resultados pueden ser devueltos al dispositivo de comunicación móvil 30 a través de la red de comunicación 32.

En otra realización más, la fuente de iluminación 24, el filtro espacial 18 y la matriz del sensor de imágenes 16 pueden estar contenidos en una unidad independiente que está configurada para recibir un soporte de muestras 14. La unidad independiente puede estar conectada a un ordenador 26 a través de una conexión por cable (por ejemplo, USB) o inalámbrica (por ejemplo, Bluetooth). Alternativamente, la unidad independiente puede estar conectada a un dispositivo de comunicación móvil 30 a través de una conexión por cable o inalámbrica similar.

La FIG. 3 ilustra una realización de un sistema 10 en el que el sistema de obtención de imágenes holográficas sin lente está integrado en un dispositivo de comunicación móvil 30. El dispositivo de comunicación móvil 30 puede incluir un teléfono móvil, un asistente digital personal (PDA) u otro dispositivo electrónico portátil. El dispositivo de comunicación móvil 30 tiene preferentemente una funcionalidad inalámbrica, de forma que las imágenes, los datos y los resultados pueden ser transmitidos remotamente a una ubicación en remoto a través de una red de comunicación 32. Dicha transmisión inalámbrica puede producirse a través de los espectros inalámbricos y los protocolos de datos convencionales usados para el transporte de datos (por ejemplo, redes CDMA, redes GSM o similares). Los datos también pueden ser transmitidos a otro ordenador o dispositivo similar a través de otros protocolos de rango más corto, tales como Bluetooth, WiFi o similares.

La matriz del sensor de imágenes 16 (no mostrada en la FIG. 3) está ubicada en el interior del dispositivo de comunicación móvil 30. La matriz del sensor de imágenes 16 puede incluir el mismo equipo informático de obtención de imágenes usado para tomar fotos o crear películas en dichos dispositivos (por ejemplo, CMOS, CCD o equivalente). Alternativamente, la matriz del sensor de imágenes 16 puede ser un componente especializado producido específicamente para aplicaciones de obtención de imágenes holográficas. Como se observa en la FIG. 3, el dispositivo de comunicación móvil 30 incluye un cargador de muestras 38 que está configurado para dar soporte al soporte de muestras 14. Por ejemplo, el cargador de muestras 38 puede ser desplazable en una posición abierta como se ilustra en la FIG. 3, en la que el soporte de muestras 14 está posicionado en el cargador de muestras 38. Después el cargador de muestras 38 se mueve a una posición cerrada, mediante lo cual el soporte de muestras 14 con la muestra 12 es posicionado en su posición sobre la matriz del sensor de imágenes 16. Alternativamente, en otra realización, el soporte de muestras 14 (por ejemplo, un portaobjetos, una cubeta o similares) puede ser insertado directamente en el dispositivo de comunicación móvil 30 sin la ayuda de un cargador de muestras 38. En cualquier caso, la muestra 12 es colocada directamente en o sobre la matriz del sensor de imágenes 16, de forma que el plano celular 22 esté cerca del plano del detector. Una capa ópticamente transparente (no mostrada) sobre la matriz del sensor de imágenes 16 puede fijar esta distancia.

Haciendo referencia aún a la FIG. 3, el sistema 10 incluye una extensión o alojamiento 40 que está configurado para contener la fuente de iluminación 24 junto con el filtro espacial 18. La extensión 40 puede tener la forma de un alojamiento tubular o similar, aunque pueden usarse otras formas y geometrías. La extensión 40 puede estar fijada de forma permanente al dispositivo de comunicación móvil 30 o, como alternativa, la extensión 40 puede ser modular y unida/separada selectivamente del dispositivo de comunicación móvil 30. En algunas realizaciones, la longitud de la extensión 40 puede ser ajustable. La fuente de iluminación 24 es preferentemente una fuente luminosa incoherente o parcialmente incoherente, tal como un LED, como se ilustra en la FIG. 3. La fuente de iluminación 24 puede estar guiada o alimentada por la batería interna del dispositivo de comunicación móvil 30 o, como alternativa, la extensión 40 puede contener la batería 42 y/o los circuitos de guiado necesarios para alimentar la fuente de

iluminación 24. En otra alternativa más, la fuente de alimentación de un ordenador local, tal como un ordenador 26 de la FIG. 2, puede proporcionar la fuente de alimentación para que funcione la fuente de iluminación 24 (por ejemplo, a través de un cable USB o similar).

- 5 La extensión 40 incluye adicionalmente el filtro espacial 18 que contiene en el mismo la apertura 20. Como se explica en el presente documento, una importante ventaja del sistema actual 10 es que el diseño permite una cierta variación en las tolerancias mecánicas, de forma que el sistema de obtención de imágenes todavía puede operar incluso si no hay una alineación perfecta entre la fuente de iluminación 24, el filtro espacial 18 y la matriz del sensor de imágenes 16. Por lo tanto, el sistema todavía puede operar y proporcionar imágenes incluso si el dispositivo de
- 10 comunicación móvil 30 experimenta interrupciones mecánicas significativas, como podría esperarse con dicho dispositivo 30 en el campo.

- La extensión 40 tiene una longitud que generalmente aleja la apertura 20 una cierta distancia (es decir, z_1) del plano celular 22. Generalmente, la distancia entre el plano celular 22 y la apertura 20 está en el intervalo de entre
- 15 aproximadamente 1 cm y aproximadamente 10 cm. Por supuesto, esta distancia puede variar más allá de este intervalo. Esta distancia relativamente pequeña todavía permite que el dispositivo de comunicación móvil 30 sea de bolsillo y portátil incluso cuando la extensión 40 está unida o fijada de otro modo al dispositivo de comunicación móvil 30. La distancia entre el plano celular 22 y la matriz del sensor de imágenes 16 es acomodada con facilidad en el interior del dispositivo de comunicación móvil 30, pero generalmente está en el intervalo de entre 0,05 mm y 2 cm.
 - 20

- Como se ha explicado anteriormente, la extensión 40 puede ser un componente modular que puede ser sustituido o intercambiado para proporcionar, por ejemplo, fuentes de iluminación alternativas 24. Por ejemplo, una extensión 40 puede contener un LED de un color determinado, mientras que otras extensiones podrían contener unos LED de diferentes colores. Estas diversas extensiones 40 también podrían tener una longitud variable para proporcionar
- 25 diferentes características de obtención de imágenes. Estas extensiones 40 podrían llevarse en el campo como parte de un kit de obtención de imágenes. Alternativamente, una única extensión 40 puede contener múltiples fuentes de iluminación 24 (por ejemplo, más de un color de LED). Estos LED podrían estar alimentados de forma individual o conjunta al mismo tiempo. Debido a que una única extensión 40 puede contener múltiples configuraciones de LED (del mismo color o de colores diferentes), todas las fuentes pueden encenderse al mismo tiempo para la obtención
 - 30 de imágenes, o como alternativa, cada fuente de iluminación 24 puede ser encendida secuencialmente, mientras que la matriz del sensor de imágenes 16 está capturando hologramas de la muestra 12 en función del tiempo. Pueden encenderse diferentes combinaciones de estas múltiples fuentes de iluminación 24 para crear múltiples hologramas del mismo campo de imagen.

- 35 Durante el uso, la muestra 12 se coloca por encima de la matriz del sensor de imágenes 16. La muestra 12 puede cargarse en el soporte de muestras 14, tal como un portaobjetos de microscopio o un dispositivo microfluído que soporta una muestra tal como sangre completa, orina, sudor, saliva etc. El soporte de muestras 14 es insertado a continuación en el dispositivo de comunicación móvil 30, bien directamente o bien a través del uso de un cargador de muestras individual 38. Alternativamente, la muestra 12 puede dejarse caer directamente (por ejemplo, mediante
- 40 el uso de un cuentagotas o una pipeta, o similares) encima de la matriz del sensor de imágenes 16.

- La fuente de iluminación 24 se enciende y se capturan uno o más fotogramas de las imágenes de la muestra 12 con la matriz del sensor de imágenes 16. En un aspecto de la invención, el (los) procesador(es) del dispositivo de comunicación móvil 30 puede(n) ejecutar el programa informático de obtención de imágenes usado para el
- 45 procesado y el análisis de las imágenes. Alternativamente, puede usarse un USB u otra conexión conocida (por ejemplo, Bluetooth) para ejecutar el programa informático de obtención de imágenes a través de un ordenador individual o similar (por ejemplo, el ordenador 26). A este respecto, el procesado de las imágenes puede tener lugar bien en el dispositivo de comunicación móvil 30 o bien fuera del dispositivo de comunicación móvil 30 en un ordenador individual (por ejemplo, un ordenador local 26 o un ordenador en remoto 34 en la FIG. 2). Por ejemplo, los
 - 50 datos de las imágenes en bruto podrían ser comunicados por vía inalámbrica a través de una red de comunicación 32 a otro ordenador en remoto 34, que podría procesar a continuación las imágenes. Los resultados podrían ser devueltos después al dispositivo de comunicación móvil 30 a través de la misma red de comunicación inalámbrica 32. Alternativamente, el dispositivo de comunicación inalámbrica 30 puede ser independiente capaz de procesar las imágenes y proporcionar directamente los resultados al usuario.

- 55 Un dispositivo de comunicación inalámbrico 30 que tiene un sistema de obtención de imágenes holográfico sin lente 10 integrado en el mismo sigue siendo de peso ligero y portátil. Los componentes de obtención de imágenes adicionales añadidos al dispositivo de comunicación móvil 30 normalmente añaden únicamente una cantidad modesta de peso adicional, en algunos casos de menos de 40 gramos. Generalmente dicho dispositivo proporciona

un campo visual (FOV) para la obtención de imágenes que es grande. Normalmente el FOV que se puede conseguir es $> 24 \text{ mm}^2$, lo que es > 10 veces mayor que un microscopio óptico. Debido a que el sistema 10 usa unos componentes rentables, compactos y tolerantes a los errores de alineación, ofrece una solución transformativa para las necesidades de la microscopía, la citometría y el diagnóstico médico, particularmente en entornos con pocos recursos.

En el sistema 10, la fuente de iluminación 24 pasa la luz a través de la apertura 20 del filtro espacial 18. Esta luz LED filtrada espacialmente, después de viajar por el aire una distancia que normalmente es de varios centímetros, interactúa con la muestra 12, donde cada célula/partícula de la muestra 12 dispersa y refracta la luz LED incidente según su tamaño, su morfología tridimensional, los elementos subcelulares y el índice de refracción. La interferencia de las ondas luminosas que pasan a través de las células con la luz LED no dispersada crea el holograma de cada célula, que es detectado mediante el uso de la matriz del sensor de imágenes 16. El holograma sin lente de cada célula es muy detallado y permite una reconstrucción rápida de su imagen microscópica a través de un procesamiento digital.

En un aspecto, la matriz del sensor de imágenes 16 que se usa es un sensor de imágenes basado en el color que está instalado en, o es fabricado con, el dispositivo de comunicación móvil 30. Una matriz del sensor de imágenes basada en el color 16, a diferencia de una monocromática, tiene filtros de color en cada píxel que producen lo que se conoce como el patrón de Bayer, formado por una matriz periódica de píxeles rojo-verde-azul (RBG). En un microscopio holográfico sin lente normal, un sensor de color no sería la elección óptima, dado que no todos los píxeles recibirían una luz suficiente bajo una iluminación cuasi-monocromática (por ejemplo, $\sim 587 \text{ nm}$). Para abordar este problema de la distorsión del holograma debido al patrón de Bayer de la imagen, el proceso de reconstrucción de la imagen digital implica una etapa adicional de conversión del formato en bruto (imagen del patrón de Bayer) en una imagen monocromática equivalente antes de llevar a cabo la reconstrucción holográfica de las imágenes de las células o partículas.

Una imagen en color digital está representada como una matriz de píxeles, estando cada píxel representado por una mezcla de colores primarios. Los colores primarios habituales usados por la mayor parte de las cámaras comercializadas son Rojo, Verde y Azul (RGB). En un caso ideal, estos colores pueden ser registrados por separado dividiendo el haz de luz sobre tres sensores diferentes, registrando cada uno un color. Sin embargo, por razones económicas, las cámaras de los dispositivos de comunicación móviles 30 normalmente usan un único chip sensor de imágenes que está cubierto por una matriz de filtro de color (CFA) diseñada con diversos patrones. El patrón de la CFA usado más ampliamente en la industria de adquisición de imágenes se denomina patrón de Bayer, que emplea un patrón repetitivo de 2×2 que consiste en un filtro azul, uno rojo y dos verdes. Por lo tanto, el producto en bruto de una matriz del sensor de imágenes 16 mediante el uso de un CFA del patrón de Bayer, que habitualmente se denomina imagen del patrón de Bayer, está formado por píxeles que portan información relativa a uno de los tres canales primarios. El proceso de fusión de estos tres canales con objeto de obtener una imagen a todo color se denomina interpolación.

Existe una amplia cantidad de bibliografía sobre los diferentes métodos de interpolación, respondiendo cada uno a las necesidades de las diferentes aplicaciones. Sin embargo, para los fines de la microscopía holográfica en los teléfonos móviles, dichos algoritmos de interpolación típicos generalmente eliminarían las oscilaciones de amplitud de alta frecuencia, que son necesarias para el proceso de reconstrucción holográfica. Por lo tanto, el uso de la información registrada en su formato más puro tiene una ventaja significativa en la prevención de artefactos no deseados que pudieran ser introducidos por los algoritmos de interpolación convencionales. Para preservar las firmas de difracción holográfica de los objetos microscópicos, se ha desarrollado un algoritmo de interpolación para obtener imágenes en escala de grises con menos distorsión para los patrones holográficos adquiridos. A diferencia de los algoritmos de interpolación convencionales, donde se aspira a obtener una imagen de RGB mediante la interpolación de los canales ausentes en cada píxel, conservando la correlación inter-píxel así como la inter-canal, la principal aspiración de este algoritmo de interpolación era maximizar la correlación espacial. Por lo tanto, el producto en bruto del dispositivo de comunicación móvil 30 se trata como una imagen monocroma que tiene artefactos con patrones que deben ser mejorados.

Para un patrón holográfico sin lente recogido por un sensor en color, la longitud de la onda de iluminación es bastante importante para asegurar un rendimiento de muestreo espacial óptimo. Como se ha explicado anteriormente, el 50 % de los píxeles de un sensor de color que usa un patrón de Bayer CFA es sensible al verde, el 25 % al azul y el 25 % al rojo. Debido a que se desea tener todos los píxeles insaturados por encima del nivel de ruido que sean posibles, la longitud de onda de la fuente de iluminación 24 (por ejemplo, el LED) se selecciona para que esté en una banda donde ambos píxeles rojo y verde tengan una elevada eficacia de detección. Por lo tanto, se

usó un LED a ~ 587 nm, que tiene un rendimiento aceptable para los canales del rojo y del verde.

Sin embargo, bajo esta iluminación cuasi-monocromática, la imagen holográfica en bruto resultante en el sensor de color adolece principalmente de dos artefactos. En primer lugar, a pesar de que los canales del rojo y del verde portan información con una elevada proporción entre señal y ruido, no están igualmente iluminados y por lo tanto se requiere llevar a cabo una ecualización entre los valores pertenecientes a estos dos canales. En segundo lugar, como resultado de la selección de una longitud de onda a la cual los píxeles azules no son lo suficientemente sensibles, el tercer canal (azul) está muy corrompido por el ruido. Por lo tanto, se requiere una predicción de todos los píxeles azules mediante el uso de los píxeles verdes y rojos vecinos.

El desequilibrio en la detección entre los niveles de intensidad de los canales verde y rojo es compensado mediante el uso de una imagen de fondo adquirida con unas condiciones de iluminación idénticas a las que se usaron para la captura de los hologramas sin lente de los objetos. Esta imagen de fondo proporciona una matriz del coeficiente de normalización que determina el factor de escalado para cada píxel de la imagen holográfica. Este método no sólo ecualiza los canales del verde y del rojo, sino que también compensa cualquier potencial artefacto causado por la iluminación no uniforme en el plano del sensor.

Una vez que se ha llevado a cabo esta etapa de ecualización del canal, el problema que queda es la predicción del canal azul ausente. La estrategia para la interpolación de los píxeles azules incluye una etapa de estimación, que se lleva a cabo mediante el uso de una interpolación compatible con edge, seguida de una etapa de refinado que mejora esta predicción inicial de forma iterativa mediante el uso del método de recuperación de la fase (descrito a continuación), que ha sido adaptado para la reconstrucción de imágenes holográficas sin lente.

Cuando se considera un bloque mayor de 3×3 píxeles, el problema de la predicción del canal ausente también puede ser interpretado como una estimación de un píxel ausente (azul) que está rodeado por ocho píxeles conocidos (rojos y verdes). La forma más simple de estimar este píxel desconocido es un promediado directo de los ocho píxeles vecinos. Sin embargo, dicha estrategia supervisaría los cambios de alta frecuencia en el holograma sin lente. En su lugar se usó un algoritmo de interpolación compatible con edge que ajusta la estimación de los píxeles ausentes tomando como base las magnitudes de las derivadas espaciales en cada una de las cuatro direcciones. Los detalles adicionales del algoritmo pueden consultarse en la publicación titulada "Lensfree Microscopy on Cellphone," de Tseng et al. Lab Chip, 21 de julio de 2010, 10 (14): 1787-92, que se incorpora como referencia en el presente documento como si se hubiera mencionado en su totalidad.

La FIG. 4 ilustra una representación esquemática del algoritmo de de-Bayering desarrollado para la creación de imágenes holográficas monocromas a partir del producto del patrón de Bayer de nuestro sistema 10. Los canales rojo y verde de la imagen holográfica en bruto adquirida son ecualizados mediante el uso de una imagen de fondo que fue registrada en unas condiciones de iluminación idénticas a las del objeto. Los píxeles azules se estiman a partir de sus vecinos rojos y verdes (que incluyen mucha información de la SNR) mediante el uso de una estrategia de interpolación compatible con edge, y son refinados adicionalmente a través de un proceso de recuperación iterativo con la ayuda de una máscara de soporte de objetos generada automáticamente. Finalmente, el holograma recuperado es sobremuestreado e introducido en un algoritmo de reconstrucción holográfico para crear las correspondientes imágenes microscópicas de los objetos.

La FIG. 5 ilustra un sistema 50 según otra realización de la invención. En este sistema alternativo 50, una plataforma de obtención de imágenes incorporada en el chip incluye o combina la obtención de imágenes holográficas sin lente (por ejemplo, la FIG. 1) con la detección fluorescente sin lente en un amplio campo visual. El sistema incluye la fuente de iluminación 24 que proporciona la fuente de iluminación incoherente para la holografía digital, según se ha explicado anteriormente. También está incluido el filtro espacial 18 junto con la apertura 20. El sistema 50 incluye adicionalmente un soporte de muestras 14 que contiene la muestra 12 en el mismo. La muestra 12 incluye microobjetos tales como las células 52, según se ilustra en la FIG. 5. El soporte de muestras 14 puede incluir un dispositivo basado en microfluidos que contiene canales o similares, para llevar o transportar las células 52.

Haciendo referencia aún a la FIG. 5, el sistema 50 incluye una fuente de excitación fluorescente 52 que está configurada para emitir radiación en una o más longitudes de onda para la excitación fluorescente. La fuente 52 puede incluir un LED o una lámpara de xenón ajustada mediante un monocromador. La fuente de excitación fluorescente 52 está orientada preferentemente en ángulo con respecto al soporte de muestras 14. La radiación fluorescente procedente de la fuente de excitación fluorescente 52 es suministrada al volumen de la muestra a través de un prisma 56 (por ejemplo, un prisma romboidal). Ubicada subyacente al soporte de muestras 14 hay una capa de vidrio 58 que se usa para reflejar la radiación de excitación a través de la superficie de reflexión interna total

(TIR) 60. La capa de vidrio 58 puede tener un espesor del orden de aproximadamente 100 μm . Hay dispuesta una matriz del sensor de imágenes 16 en la parte posterior de la capa de vidrio 58 que se usa para la captura de las imágenes holográficas, así como de las imágenes fluorescentes. Interpuesto entre la capa de vidrio de TIR 58 y la matriz del sensor de imágenes 16 hay un filtro de adsorción 60. El filtro de adsorción 60 es generalmente delgado, 5 teniendo un espesor generalmente inferior a 100 μm .

Como se observa en la FIG. 5, la altura del prisma 56 era de 17 mm. El tamaño ($w_1 \times w_2$) de la matriz del sensor de imágenes 16 es de 25 x 35 mm. La profundidad del depósito de la solución, k era de entre 10-100 μm . La distancia de la fuente vertical, h era de aproximadamente 5-10 cm). La distancia de la fuente de excitación fluorescente, f era de aproximadamente 1-2 cm. Debería entenderse que se pretende que otros tamaños más allá de los mencionados 10 específicamente más arriba estén en el ámbito de la invención. No mostrado en la FIG. 5, ya que es opcional, también puede usarse un gel de compatibilización del índice para evitar la TIR y una dispersión indeseada en la cara inferior del prisma 56. El delgado filtro de absorción 62 ilustrado en la FIG. 5 actúa como una capa protectora en este caso, aislando la región activa de la matriz del sensor de imágenes 16 de los microcanales del soporte de muestras 14. Un ejemplo del filtro de absorción 62 puede obtenerse en Roscolux (por ejemplo, de 30 dB para $< 600 \text{ nm}$; de 0,075 mm de espesor) (Rosco Laboratories, Inc., Stamford, CT).

Después de la excitación de las partículas/células, el "haz de bombeo" de la radiación fluorescente se filtra a través de una reflexión interna total (TIR) en la superficie de TIR 60. La misma interfase superior o plana 56 del prisma 20 también permite la realización de una holografía incoherente sin lente simultáneamente para el mismo campo visual. El centro de la masa de cada punto fluorescente en las imágenes sin lente solapa en el espacio bidimensional con las imágenes holográficas reconstruidas de las partículas fluorescentes, lo que permite la separación de las partículas fluorescentes entre sí y de las que no son fluorescentes en el mismo campo visual. Dicha capacidad de obtención de imágenes dobles es bastante útil, especialmente para aumentar la especificidad y la funcionalidad de la 25 obtención de imágenes sin lente incorporada en un chip. Estos resultados no habían sido posibles con otras estrategias holográficas sin lente, dado que con una mayor distancia entre la muestra y el sensor (por ejemplo, $> 1 \text{ mm}$), cada punto fluorescente sería entonces bastante más difícil de detectar en un chip sin el uso de ninguna lente.

La configuración para la obtención de imágenes dobles sin lente ilustrada en la FIG. 5 presenta diversas ventajas. 30 En primer lugar, el uso de una TIR para bloquear el haz de excitación es bastante eficaz para rechazar las potencias de bombeo elevadas y trabaja de forma independiente de las longitudes de onda de excitación y de emisión. Además, la apertura numérica de detección (NA) del sistema 50 es próxima a 1,0, dado que la matriz del sensor de imágenes de gran área 16 (por ejemplo, de 3,5 cm x 3,5 cm) está colocada muy cerca de los microobjetos fluorescentes, lo que la hace muy eficaz para la detección de fotones. En otras palabras, únicamente se pierden los 35 rayos fluorescentes oblicuos que forman la apertura numérica entre ~ 1 y $\sim 1,3$ (índice de refracción del medio del interior del canal) sin que alcancen la matriz del detector. Mientras tanto, a diferencia de microscopio basado en una lente, esta amplia apertura de detección numérica no contribuye directamente a la resolución espacial en el sistema 50 debido a su funcionamiento sin lente.

Esta superficie de TIR 60 es también bastante útil dado que evita el uso de filtros fluorescentes basados en película fina, que dependen de la longitud de onda y de la dirección de la iluminación, lo que los hace inconvenientes y costosos para un funcionamiento sin lente. Además, puede usarse un económico filtro de absorción basado en plástico 62 para filtrar la luz de excitación débilmente dispersada que no obedece a la TIR. Los requisitos para el comportamiento de este filtro están reducidos en gran medida debido a la eficacia de la TIR para rechazar el haz de 45 excitación, es decir, un económico filtro de absorción 62 con una proporción de rechazo menor de 30 dB sería suficiente para la obtención de imágenes fluorescentes sin lente en un chip.

Las FIG. 6(a) - 6(k) ilustran la obtención de imágenes sin lente holográficas y fluorescentes del mismo campo visual que se obtienen secuencialmente para una solución heterogénea. Al controlar la cronología de la excitación y de los haces de obtención de imágenes holográficas (por ejemplo, la fuente de iluminación 24 y la fuente de excitación 50 fluorescente 54), se pueden registrar imágenes tanto fluorescentes como holográficas del mismo campo visual sin el uso de ninguna lente, láseres, filtros de película fina ni ningún otro componente mecánico. La FIG. 6(a) ilustra la imagen fluorescente sin lente de la solución heterogénea que consiste en microesferas de 10 μm fluorescentes (λ central de excitación/emisión: 580 nm/605 nm), de 10 μm NO fluorescentes, de 20 μm NO fluorescentes. Como se 55 esperaba, únicamente aparecen en esta imagen las partículas fluorescentes. El tiempo de integración para esta imagen fue de un segundo.

La FIG. 6(b) ilustra la imagen holográfica sin lente del mismo campo visual se muestra, donde esta vez todas las partículas de la solución proyectan una sombra en el sensor. Las FIG. 6(e), (h) y (k) son regiones de interés

ampliadas tomadas a partir de la imagen del holograma en bruto mostrada en la FIG. (b). Las FIG. (d), (g) y (j) son imágenes reconstruidas de las mismas regiones ampliadas. Como se esperaba, todas las partículas están presentes en esta imagen holográfica reconstruida. Las FIG. 6(c), (f) e (i) son imágenes de microscopía de transmisión del mismo campo visual con fines comparativos. Tomando como base la imagen fluorescente sin lente del mismo campo visual, se pueden distinguir las partículas fluorescentes de las no fluorescentes en la imagen holográfica reconstruida. Nótese que los resultados de la reconstrucción holográfica no se ven afectados por la estructura granular del filtro de absorción 62, lo que permite el uso de componentes bastante rentables de bajo coste.

Mientras que las FIG. 6(a) - 6(k) ilustran la obtención de imágenes de microesferas fluorescentes, puede usarse el mismo sistema 50 para obtener imágenes de objetos biológicos tales como células o incluso organismos completos. El sistema 50 se ha usado, por ejemplo, para la obtención de imágenes fluorescentes sin lente en un chip de *Caenorhabditis elegans* transgénico (*C. elegans*) a lo largo de un campo visual (FOV) muy amplio de, por ejemplo, > 2-8 cm² con una resolución espacial de 10 µm. Se usó un sistema 50 como el ilustrado en la FIG. 5 para la obtención de imágenes de *C. elegans*. Después de interactuar con la totalidad del cuerpo del gusano, los fotones de la bomba son rechazados por la TIR que se produce en la superficie de TIR 60. Para crear un campo de fondo lo suficientemente oscuro, los fotones de la bomba débilmente dispersados que no obedecen a la TIR también son rechazados por un filtro de absorción adicional 62, como resultado de lo cual únicamente la emisión fluorescente de los objetos es detectada por la matriz del sensor de imágenes 16.

Nótese que, a diferencia de la microscopía fluorescente convencional basada en lentes, el uso de filtros de interferencia de película fina 62 en nuestra plataforma no es trivial dado que el rechazo de los fotones de la bomba en una configuración de obtención de imágenes sin lente requeriría la deposición de películas de interferencia con un espesor mucho mayor para bloquear un gran intervalo angular de los fotones de la bomba. Esto no sólo aumenta el coste sino que también requiere el uso de sustratos considerablemente gruesos debido a un mayor estrés en la película más gruesa, lo que debilita significativamente la SNR de la función de dispersión de puntos (PSF) fluorescentes, degradando también la resolución alcanzable. Por lo tanto, se fabricaron filtros basados en absorción que tienen colorantes recubriendo sustratos de vidrio ultrafino (~30 µm).

La receta para la fabricación de los filtros de absorción delgados 62 incluye la disolución de colorantes Orasol en un pequeño volumen de ciclopentanona y la posterior adición de KMPR 1005 Photoresist (concentración del colorante de ~ 0,4 g ml⁻¹), tras lo cual se elimina el exceso de material colorante mediante el uso de un filtro mecánico de 0,45 µm de diámetro. Esta etapa está seguida por un recubrimiento giratorio rotatorio durante 20 segundos a 2.000 rpm, un horneado durante 300 segundos a 100 °C, una exposición por inundación a 13 mW/cm² durante 35 segundos, y finalmente un horneado durante otros 120 segundos a 100 °C. Tomando como base esta receta, se fabricaron diferentes filtros de absorción de paso largo con unas longitudes de onda de corte de 510 nm, de 540 nm y de 600 nm mediante el uso de diversos tipos de colorantes Orasol, incluyendo amarillo 2RLN, naranja G y rojo BI, respectivamente. La proporción de rechazo (~ 30-40 dB) de estos filtros de absorción fabricados es lo suficientemente grande como para crear el necesario campo de fondo oscuro (junto con la TIR), lo que los hace bastante útiles en las aplicaciones de obtención de imágenes fluorescentes sin lente en un chip.

Una vez fabricados, estos filtros de absorción (con un espesor total de ~40 µm; 10 µm del filtro + 30 µm del sustrato de vidrio) se colocaron directamente en la parte superior de la región activa de la matriz del sensor de imágenes 16, actuando también como una capa protectora para la superficie del sensor expuesta. También se usó un sustrato de vidrio ultrafino desechable adicional (~30 µm de espesor) entre la muestra y el filtro de absorción 62.

Al igual que para la excitación, se usó una fuente luminosa incoherente 54, que estaba acoplada con una lámpara de xenón ajustada espectralmente a ~ 580 nm (con un ancho de banda de 15 nm) a través de un monocromador (MS260i, Newport). Durante los experimentos, la potencia de excitación total se mantuvo a ~ 1,0-1,5 mW para un FOV de > 2 cm².

Además de la obtención de imágenes fluorescentes sin lente, la misma plataforma en chip mostrada en la FIG. 5 también permite la obtención de imágenes holográficas sin lente de las mismas muestras a través de la faceta superior del mismo prisma 56 que se usa en la excitación fluorescente. Esta iluminación vertical se consigue mediante una fuente incoherente 24 (es decir, un LED, pico a 632 nm y ancho de banda de ~ 20 nm) que está filtrada espacialmente con una apertura 20 (de ~0,05-0,1 mm) para conseguir la obtención de imágenes de transmisión holográfica en la misma plataforma en el chip.

El *C. elegans* transgénico usado en la investigación es ampliamente estudiado para comprender mejor las conexiones entre las células musculares y las motoneuronas relacionadas. A este respecto, el gen UNC 122 es

inyectado en los gusanos conjuntamente con un marcador fenotípico (mCherry; longitud de onda de emisión: 610 nm). Para la preparación de estas muestras transgénicas de *C. elegans* para la obtención de imágenes en un chip, se extrajo una pequeña porción del medio de crecimiento del nematodo (NGM) a partir de la placa de cultivo con una herramienta esterilizada. Esta muestra se disolvió en un medio paralizante (~ 200 µl) que se preparó con 10 mM de levamisol. Para desprender los gusanos del medio de gel, la alícuota se agitó suavemente vorticialmente y se centrifugó. Mediante el uso de una pipeta, los gusanos transgénicos son transferidos después al soporte de muestras 14 para la obtención de imágenes sin lente sobre el chip.

Se usó un reactivo de inmovilización, es decir, levamisol, para evitar las imágenes borrosas, lo que también permitió la captura de imágenes de comparación de las mismas muestras mediante el uso de un microscopio fluorescente convencional. Nótese también que para evitar daños físicos a los gusanos adultos, también se usaron separadores mecánicos tales como partículas no fluorescentes (de ~ 50-100 µm de diámetro) en los experimentos de obtención de imágenes.

Los resultados de estos experimentos de obtención de imágenes se resumen en las FIG. 7 y 8, que también proporcionan imágenes de un microscopio fluorescente convencional de las mismas muestras con fines comparativos. Las firmas fluorescentes sin lente en bruto de los gusanos están muy borrosas debido a las amplias PSF. Sin embargo, mediante el uso de las PSF medidas de cada plataforma, estas firmas sin lente pueden ser descodificadas compresivamente para producir digitalmente imágenes con una resolución mucho mayor de las regiones fluorescentes ubicadas en el cuerpo del *C. elegans*, que concuerdan muy bien con las imágenes obtenidas mediante el uso de un microscopio fluorescente normal basado en lentes.

La FIG. 7 ilustra las imágenes fluorescentes sin lente en chip de *C. elegans* transgénico, se muestran para tres animales individuales mediante el uso de la matriz del sensor de imágenes KAF-8300 16 (KODAK KAF-8300 - tamaño de píxel de 5,4 µm, área activa de obtención de imágenes de ~ 2,4 cm²). Las imágenes (a4), (b4) y (c4) ilustran las imágenes fluorescentes en bruto sin lente, todas las cuales parecen borrosas en el plano del detector. La descodificación compresiva, analizada con más detalle a continuación, de estos patrones borrosos, permitieron la reconstrucción digital de las imágenes fluorescentes con una resolución mucho mayor de estas muestras de *C. elegans* según se muestra en (a5), (b5) y (c5), respectivamente. Además, las imágenes del microscopio fluorescente con lente con un objetivo de 10x de los mismos gusanos mostradas en (a2), (b2) y (c2) concuerdan bien con las imágenes fluorescentes sin lente descodificadas. Además de la obtención de imágenes fluorescentes, la misma plataforma sin lente también permite la obtención de imágenes de transmisión holográficas de las mismas muestras, de forma que pueden crearse imágenes híbridas mediante la superposición de las imágenes fluorescentes descodificadas sin lente y de las imágenes holográficas reconstruidas, según se muestra en (a6), (b6) y (c6).

También se proporcionan comparaciones al microscopio de las mismas muestras en (a3), (b3) y (c3), respectivamente. Se observan unas ligeras rotaciones de los gusanos entre las imágenes descodificadas sin lente y sus imágenes comparativas al microscopio, dado que están adquiridas en diferentes experimentos.

La FIG. 8 ilustra las imágenes fluorescentes sin lente en chip de *C. elegans* transgénico, se muestran mediante el uso de la matriz del sensor de imágenes KAF-11002 16 (KODAK KAF-11002 - tamaño de píxel de 9 µm, 11 MPíxeles). De forma similar a la FIG. 7, la imagen fluorescente sin lente descodificada de la muestra de *C. elegans* transgénico proporciona una buena concordancia con una imagen del microscopio fluorescente convencional del mismo gusano (adquirida con una lente de objetivo de 10x, NA = 0,25). Se observa una ligera rotación del gusano entre la imagen descodificada sin lente y su imagen de comparación al microscopio, dado que ambas se adquirieron en experimentos diferentes.

La descodificación compresiva permite una reconstrucción precisa de la distribución fluorescente en el plano del objeto basándose en la PSF medida de la plataforma de obtención de imágenes sin lente, consiguiendo una resolución espacial de, por ejemplo, ~10 µm sobre > 2-8 cm² de FOV. Esta receta numérica se basa en la teoría de muestreo compresivo que presenta un nuevo método para la reconstrucción de una señal dispersa a partir de su representación submuestreada. La obtención de imágenes fluorescentes de campo amplio de muestras de *C. elegans* en un chip aporta por definición una dispersión al problema de obtención de imágenes, dado que la mayor parte del FOV ya es oscuro (es decir, no es fluorescente). Tomando como base esta conexión con la teoría de muestreo compresivo, las imágenes fluorescentes en bruto sin lente pueden ser rápidamente descodificadas (mediante el uso de la PSF fluorescente medida) para mejorar significativamente la potencia de resolución de la plataforma.

Este proceso de descodificación compresiva puede ser formalizado como un problema de mínimos cuadrados

normalizado en I_1 , de forma que:

$$\hat{i} = \operatorname{argmin} \left\| F_{\text{det}} - P_{\text{conv}} \cdot \hat{i} \right\|_2 + \alpha \cdot \left\| \hat{i} \right\|_1 \quad \text{Eq. (1)}$$

- 5 en la que F_{det} es la imagen presente en bruto detectada en la matriz del sensor; P_{conv} representa la matriz de convolución bidimensional basada en la PSF fluorescente del sistema; $\hat{i}$ es la distribución de la fuente fluorescente que crea la imagen sin lente en el plano de la matriz del sensor de imágenes 16; α es un parámetro de normalización no negativo; y $\|x\|_p$ representa la norma l_p del vector x . El algoritmo de optimización usado en este trabajo se basa en el método del punto interior truncado de Newton que converge rápidamente a una solución
10 presente dispersa (7) basada en la ecuación Eq. (1).

Estos resultados experimentales demuestran con éxito la eficacia de la estrategia de descodificación compresiva para la obtención de imágenes de muestras de *C. elegans* transgénico mediante el uso de una obtención de imágenes fluorescentes sin lente en chip sobre un FOV muy amplio que cubre la totalidad del área activa del chip de
15 CCD (por ejemplo, $> 2\text{-}8 \text{ cm}^2$). Como se ha explicado anteriormente, además de la obtención de imágenes fluorescentes, el sistema 50 también permite la obtención de imágenes de transmisión holográfica de los gusanos mediante el uso de la interfase superior del prisma 56 que se usa en la excitación fluorescente. En esta estrategia de obtención de imágenes holográficas sin lente, una fuente espacialmente incoherente cuasi-monocromática 24, tal como un diodo emisor de luz (LED), ilumina las muestras de interés después de haber sido filtrada espacialmente
20 por una gran apertura 20 (por ejemplo, de 0,05-0,1 mm de diámetro). Esta fuente luminosa incoherente recoge la coherencia espacial parcial, que es lo suficientemente grande como para registrar hologramas sin lente en línea de los gusanos sobre la matriz del sensor de imágenes 16. Estas hologramas adquiridos en línea pueden ser entonces rápidamente procesados mediante el uso de algoritmos de recuperación iterativos para crear imágenes de
25 de imágenes 16, coincidiendo con el FOV de la obtención de imágenes del canal fluorescente. Las FIG. 7 y 8 ilustran dichas imágenes holográficas sin lente reconstruidas de las muestras, en las que también estaban superpuestas digitalmente las imágenes fluorescentes sin lente de los mismos gusanos, creando una imagen híbrida del *C. elegans* (es decir, tanto fluorescente como de transmisión). A partir de estas imágenes sin lente es evidente que la resolución espacial de la plataforma es modesta en comparación con un microscopio normal basado en lentes. Por
30 otro lado, las principales ventajas de nuestra plataforma son su muy amplio FOV y su diseño compacto, que proporciona una importante concordancia para el cribado de rendimiento ultra-alto de muestras de *C. elegans* en sistemas microfluidos automatizados.

La FIG. 9 ilustra un sistema de obtención de imágenes sin lente alternativo 70 que también puede realizar la
35 obtención de imágenes fluorescentes de muestras de *C. elegans*. En esta configuración modificada, se inserta una placa frontal óptica de fibra 72 por debajo del soporte de muestras 14 para controlar y ajustar la PSF fluorescente de la plataforma de obtención de imágenes. La descodificación compresiva de las muestras de *C. elegans* transgénico mediante el uso de estas PSF fluorescentes alteradas produce unos resultados de imágenes similares a los de las FIG. 7 y 8. El sistema modificado 70 puede ajustar convenientemente la PSF fluorescente de la plataforma de
40 obtención de imágenes para mejorar la SNR de la detección, especialmente con unos huecos mayores entre los planos del objeto y del sensor. Esto podría ser una ventaja importante si se requiere una separación física entre la muestra 12 y la matriz del sensor de imágenes 16.

El uso de una placa frontal óptica de fibra 72 puede ser utilizado para proporcionar una mejor SNR de la detección y
45 para conseguir una mayor resolución espacial. La placa frontal óptica de fibra 72 suministra la luz fluorescente emitida a la matriz del sensor de imágenes 16. La placa frontal óptica de fibra consiste generalmente en una matriz de fibras que tiene un espesor de aproximadamente 1 cm, teniendo cada fibra una apertura numérica de aproximadamente 0,3. La FIG. 10A ilustra una representación esquemática del sistema de obtención de imágenes fluorescentes sin lente en chip 70. Este sistema de imagen 70 tiene un aumento unitario tal que el campo visual para
50 la obtención de imágenes es igual al área activa total de la matriz del sensor (es decir, $> 8 \text{ cm}^2$). La condición de TIR se produce en la interfase de vidrio-aire en la faceta inferior del vidrio de cubierta (la superficie de TIR 60). Para evitar la detección de los fotones de la bomba dispersados se usa un filtro de absorción de plástico después de placa frontal. Tamaño típico: $w_1 \times w_2 = 25 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$; $p = 1,7 \text{ cm}$; $k \sim 10\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$; $f = 1\text{-}2 \text{ cm}$. La FIG. 10B ilustra una imagen de microscopio de la placa frontal óptica 72.

55 Puede usarse un algoritmo basado en un muestreado compresivo para reconstruir rápidamente la distribución dispersa de las fuentes fluorescentes, para conseguir una resolución espacial de aproximadamente $10 \text{ }\mu\text{m}$ a lo largo de la totalidad de la región activa de la matriz del sensor, es decir, a lo largo de un FOV de obtención de imágenes

de $> 8 \text{ cm}^2$. Dicho sistema 10 podría ser especialmente significativo para la citometría de obtención de imágenes de alto rendimiento, el análisis de células raras, así como la investigación con micromatrices. Los detalles adicionales relativos al algoritmo pasado en un muestreado compresivo pueden obtenerse en Coskun et al., Lensless wide-field fluorescent imaging on a chip using compressive decoding of sparse objects, Optics Express, Vol. 18, publicación 10, páginas 10510-10523 (2010), que se incorpora como referencia en el presente documento como si se hubiera mencionado en su totalidad.

Cuando se compara con los trabajos anteriores de detección de imágenes fluorescentes sin lente, la placa frontal óptica de fibra 72 da como resultado una mejora de ~ 5 veces en la resolución espacial sin sacrificar el FOV, lo que atribuimos al uso de la placa frontal de fibra óptica y al procesamiento numérico basado en el muestreado compresivo. Adicionalmente, con este sistema alternativo 70, se usa la obtención de imágenes fluorescentes sin lente de microcanales apilados verticalmente, todos en paralelo, aumentando adicionalmente el rendimiento. Este sistema particular 70 está bien adaptado para aplicaciones en las que las células objetivo de interés son raras, tales como células cancerosas en circulación en sangre completa.

Como se explica en el presente documento, los sistemas 10, 50, 70 utilizan una matriz del sensor de imágenes 16 para la obtención de las imágenes de amplitud del holograma en bruto del objeto de interés. Después se recupera la fase perdida del holograma. La información de la fase recuperada, junto con la información de la amplitud medida, se usan para reconstruir digitalmente una imagen del objeto u objetos de interés. La FIG. 11 ilustra un diagrama de flujo de nivel superior de cómo los sistemas 10, 50 y 70 reconstruyen digitalmente una imagen del objeto de interés. Como se observa en la operación 500 de la FIG. 11, se carga una muestra 12 en el sistema 10, 50, 70. Después se obtienen las imágenes holográficas en bruto en la operación 510. La información de la fase "perdida" se recupera a continuación en la operación 520. Tomando como base la información de la fase recuperada y las imágenes holográficas en bruto, se reconstruyen digitalmente a continuación una o más imágenes de la muestra, según se describe en la operación 530.

Para la reconstrucción digital de las imágenes del objeto a partir de sus hologramas existen dos estrategias que pueden llevarse a cabo: (1) retropropagar los componentes de Fourier de la *intensidad* de cada holograma del objeto; y (2) recuperar la fase bidimensional de la *amplitud* de cada holograma. Estas dos técnicas permitieron independientemente la reconstrucción exenta de imágenes dobles de los microobjetos a partir de sus hologramas en bruto. Estas estrategias de reconstrucción digital pueden considerarse de hecho parte de un abanico más amplio de técnicas de recuperación de fase interferométricas y no interferométricas. En estas dos estrategias, se ha usado la función de transferencia de la integral de Rayleigh-Sommerfeld sin ninguna aproximación para la retropropagación de los campos.

La primera estrategia mencionada anteriormente funciona con la intensidad de los hologramas detectados, y es susceptible al bien conocido problema de imágenes dobles. Para eliminar el artefacto de imágenes dobles en esta primera estrategia se implementó un algoritmo numérico que puede limpiar de forma iterativa las imágenes reconstruidas a partir de la imagen doble. En el segundo método de reconstrucción se usan las amplitudes de los hologramas sin lente (en lugar de sus intensidades) para recuperar la información de fase bidimensional del campo de difracción complejo que se perdió durante el proceso de detección. Esta etapa de recuperación de la fase es adicionalmente útil, ya que también crea otra textura bidimensional única para cada tipo celular, de forma que estos hologramas de fase bidimensionales recuperados también pueden ser utilizados para la caracterización de una solución heterogénea. Una vez que se ha recuperado la totalidad del campo de difracción complejo, la imagen microscópica puede ser calculada sin ningún artefacto de imagen doble a través de la retropropagación del campo complejo.

Para la holografía incoherente de células, estas dos estrategias producen unos resultados de recuperación muy similares. Sin embargo, para microorganismos a una escala mayor, la estrategia de recuperación de fase bidimensional analizada anteriormente presenta unas ciertas ventajas. Para un organismo grande, los campos de luz dispersados no pueden interferir siempre de forma eficaz con la luz de fondo, de forma que los términos de difracción holográfica comienzan a perder sus potencias relativas. Sin embargo, la estrategia de recuperación de la fase trata la cantidad detectada como la amplitud de un campo de difracción complejo, e intenta recuperar de forma iterativa su fase para una reconstrucción digital. Por lo tanto, la estrategia de reconstrucción basada en la recuperación de la fase es especialmente útil para la obtención de imágenes sin lente de células con una elevada dispersión o para organismos a una escala mayor, en los que los términos de interferencia cruzada comienzan a dominar sobre la difracción holográfica. Como sacrificio, el producto del espacio-ancho de banda que es necesario en el extremo del detector está aumentado en dos veces para la técnica de recuperación de la fase cuando se compara con la primera estrategia, dado que esta última no sólo se ocupa del término de difracción holográfica, sino

que también se ocupa de los términos de autointerferencia.

- La reconstrucción microscópica puede utilizar operaciones sucesivas de una transformación rápida de Fourier (FFT), en las que después de la FFT inicial de cada iteración, se ha aplicado la función de transferencia de la integral de Rayleigh-Sommerfeld sin ninguna aproximación a los componentes de Fourier del holograma de la célula. Debido a que se usa la FFT, las recuperaciones presentadas también son bastante rápidas en términos de tiempo de computación digital, con un tiempo de convergencia menor de unos pocos segundos mediante el uso de, por ejemplo, un procesador Pentium a 1,6 GHz.
- 10 A pesar de las significativas ventajas prácticas del sistema de holografía celular incoherente propuesto 10, 50, 70, la iluminación incoherente no aumentará la carga en el proceso de reconstrucción numérico. Para la holografía celular incoherente sin lente con $M \gg 1$, cada célula individual todavía puede ser tratada para ser iluminada con una luz coherente. Adicionalmente, debido a sus secciones transversales microscópicas, puede asumirse que la onda incidente sobre cada microobjeto (por ejemplo, una célula) es una honda plana. Consecuentemente, la reconstrucción de cada holograma celular registrado puede llevarse a cabo asumiendo una iluminación de onda plana.

- Con objeto de difractor los frentes de onda, se usa la estrategia del espectro angular para resolver numéricamente la integral de Rayleigh-Sommerfeld. Esta computación implica la multiplicación de la transformada de Fourier del campo por la función de transferencia de propagación a través de un medio lineal e isótropo, como se muestra a continuación:

$$H_z(f_x, f_y) = \begin{cases} \exp\left(j2\pi z \frac{n}{\lambda}\right) \sqrt{1 - (\lambda f_x/n)^2 - (\lambda f_y/n)^2}, & \sqrt{f_x^2 + f_y^2} < \frac{n}{\lambda} \\ 0, & \text{de otro modo} \end{cases} \quad \text{Eq. (2)}$$

- 25 en la que f_x y f_y son las secuencias espaciales, y n es el índice de refracción del medio.

- Se llevan a cabo dos estrategias iterativas diferentes, como se ha explicado anteriormente, con objeto de reconstruir las imágenes microscópicas de las células, exentas de cualquier artefacto de imagen doble. Ambos métodos funcionan con un único holograma registrado y se basan en la restricción de que cada célula tiene un soporte finito.
- 30 En ambos métodos, los hologramas en bruto se sobremuestran normalmente en un factor de entre cuatro y seis, mediante el uso de una interpolación segmentaria cúbica antes del procedimiento de reconstrucción iterativa. Aunque el sobremuestreo no aumenta inmediatamente el contenido en información de los hologramas, todavía ofrece una mejora significativa para conseguir una recuperación de la fase más precisa y una mayor resolución en la imagen reconstruida. En primer lugar, permite la definición de un soporte de objeto más preciso al suavizar los bordes de los objetos en la retroproyección inicial del holograma. Mediante el uso de un soporte de objeto que esté más cerca de la célula real en términos de tamaño y de forma, se reduce el error de los algoritmos iterativos, al igual que se asegura una convergencia más rápida. En segundo lugar, el sobremuestreo introduce unas mayores frecuencias espaciales inicialmente portadoras de una energía nula, en el holograma. A través de las etapas de reconstrucción iterativas detalladas a continuación, estas mayores frecuencias espaciales alcanzan gradualmente una energía no nula, que permite una resolución de sub-píxel en la reconstrucción final.

Método 1:

- El primer método entra en la amplia categoría de técnicas de recuperación de fase interferométricas, y es aplicable a los casos en los que la intensidad registrada está dominada por los términos de difracción holográfica. La primera etapa es la reconstrucción digital del holograma, que se consigue mediante la propagación de la intensidad del holograma a una distancia z_2 alejada del plano del holograma que produce el frente de onda inicial U_{rec} . Como resultado de esta computación se recupera la imagen virtual del objeto junto con su imagen doble desenfoada solapante espacialmente. Es importante apreciar que la intensidad registrada también puede ser propagada a una distancia de $-z_2$. En este caso puede ser recuperada la imagen real del objeto, mientras que la imagen virtual desenfoada da lugar a la formación de la imagen doble.

Debido la pequeña distancia entre la célula y el sensor en el esquema de microscopía holográfica incoherente aquí presentado, la imagen doble puede portar unas elevadas intensidades, especialmente para unos objetos

relativamente grandes como los glóbulos blancos sanguíneos. En dichos casos, los detalles finos del interior de los microobjetos pueden quedar suprimidos. De forma análoga, las imágenes dobles de células diferentes que están cercanas entre sí quedan superpuestas, dando lugar a un aumento en el ruido de fondo. Este problema está especialmente pronunciado en la microscopía de soluciones celulares densas, en la que las imágenes dobles solapantes de muchas células reducen la precisión del recuento debido a una reducción en la SNR.

Con objeto de eliminar este artefacto de imagen doble, se utiliza una estrategia iterativa mediante el uso de restricciones de soporte finito. Esencialmente esta técnica se basa en el hecho de que la información duplicada para la fase y la amplitud del objeto existe en dos planos de reconstrucción diferentes a unas distancias de $+z_2$ y de $-z_2$ del plano del holograma, donde se recuperan las imágenes virtual y real del objeto, respectivamente. Por lo tanto, puede obtenerse una reconstrucción exenta de imágenes dobles en uno de los planos de la imagen, mientras se elimina por filtración la imagen duplicada en el otro plano. Sin una pérdida de generalidad, la imagen real se eliminó por filtración para obtener una reconstrucción exenta de imagen doble en el plano de imagen virtual en $-z_2$. Debido al tamaño finito de los microobjetos, la imagen real del objeto sólo ocupa la región interior de su soporte, mientras que la imagen doble desenfocada se disemina por fuera en una región más amplia alrededor del objeto, solapándose también con la imagen real del interior del soporte. Por lo tanto, la eliminación de la información únicamente del interior del soporte asegura que la imagen real es eliminada completamente del frente de onda reconstruido. No obstante, la información de la imagen virtual del interior del soporte también se pierde, y la técnica iterativa intenta recuperar la información ausente de la imagen virtual moviéndose hacia detrás y hacia delante entre los planos de la imagen virtual y real, recuperando más información perdida en cada iteración. El éxito de este algoritmo depende en gran medida del número de Fresnel de la geometría de registro, que viene dado por

$$N_f = \frac{n(\text{tamaño del objeto})^2}{\lambda z} \quad \text{Eq. (3)}$$

Se notifica que la técnica tiene éxito para unos números de Fresnel tan altos como de 10. Para los glóbulos rojos sanguíneos, con un diámetro de aproximadamente $7 \mu\text{m}$, las geometrías de registro típicas presentadas aquí implican unos números de Fresnel $< 0,2$; por lo tanto, el método de eliminación de la imagen doble produce unos resultados muy satisfactorios.

A continuación se detallan las etapas de eliminación de la imagen doble.

- a) Inicialmente se usa la imagen real, que es un holograma retroproyectado a una distancia de $+z_2$, para la determinación del soporte del objeto. El soporte del objeto puede ser definido bien estableciendo la intensidad umbral de la imagen reconstruida, o bien buscando su mínimo local.
- b) La región interior del soporte es eliminada y se asigna un valor constante a esta región como una estimación inicial para la parte eliminada de la imagen virtual del interior del soporte, según se muestra a continuación:

$$U_{z_2}^{(i)}(x, y) = \begin{cases} U_{rec} & , x, y \notin S \\ \bar{U}_{rec} & , x, y \in S \end{cases} \quad \text{Eq. (4)}$$

en la que $U_{z_2}^{(i)}(x, y)$ representa el campo en el plano de la imagen real después de la iteración i^{ta} , S representa el área definida por el soporte del objeto, y $\bar{U}_{rec}$ es el valor medio de U_{rec} en el soporte.

- c) Después, el campo en el plano de la imagen real es retropropagado en $-z_2$ al plano de la imagen virtual. Idealmente, la reconstrucción en este plano debería estar exenta de cualquier distorsión por imagen doble. Por lo tanto, la región fuera del soporte puede establecerse a un valor de fondo d.c. para eliminar cualquier resto de imagen real fuera del foco en el plano de la imagen virtual. Sin embargo, esta restricción se aplica suavemente, según se determina mediante el siguiente parámetro de relajación β , en lugar de ajustar bruscamente la imagen a un nivel de d.c. fuera del soporte:

$$U_{-z_2}^{(i)}(x, y) = \begin{cases} D - \frac{D - U_{-z_2}^{(i)}}{\beta}, & x, y \notin S \\ U_{-z_2}^{(i)}, & x, y \in S \end{cases} \quad \text{Eq. (5)}$$

- en la que D es el fondo del campo reconstruido, que puede ser obtenido bien a partir de la imagen de fondo medida en ausencia del objeto, o bien puede elegirse simplemente como el valor medio del campo fuera de los soportes del objeto en el plano de la imagen virtual, β es un parámetro con un valor real mayor de la unidad, y normalmente se elige en aproximadamente 2-3. Un aumento en β da lugar a una convergencia más rápida, pero compromete la inmunidad de la precisión de la estimación iterativa con respecto al ruido de fondo.
- d) El campo en el plano de la imagen virtual es propagado hacia delante al plano de la imagen real, en el que la región interior del soporte tiene ahora una mejor estimación de la parte ausente de la imagen virtual. La región exterior del soporte puede ser sustituida por $U_{z_2}^{(i)}(x, y)$, el campo reconstruido original en el plano de la imagen real, como se muestra a continuación:

$$U_{z_2}^{(i+1)}(x, y) = \begin{cases} U_{z_2}^{(i)}, & x, y \notin S \\ U_{z_2}^{(i+1)}, & x, y \in S \end{cases} \quad \text{Eq. (6)}$$

- Las etapas c hasta d pueden repetirse de forma iterativa hasta que converge la imagen final. En la mayoría de los casos de este artículo, la convergencia se consigue después de 10-15 iteraciones, lo que tarda bastante menos de un minuto en un ordenador con una configuración de *hardware* modesta.

Método 2:

- El segundo método utilizado para la eliminación de la imagen doble está clasificado dentro de las técnicas de recuperación de fase no interferométricas, en el que la imagen registrada no se trata necesariamente como un holograma, sino como la intensidad de cualquier campo de difracción. Junto con la restricción de que los objetos tengan un soporte finito, esta técnica es capaz de recuperar de forma iterativa la fase del campo difractado que incide sobre el detector a partir de una imagen de intensidad única. Como resultado, puede retropropagarse el campo complejo (la amplitud y la fase) de los hologramas celulares en lugar de la intensidad, permitiendo así la reconstrucción de los objetos exentos de cualquier contaminación por imágenes dobles. Este método puede descomponerse en las siguientes etapas:
- a) la raíz cuadrada de la intensidad del holograma registrado es propagada a una distancia de $-z_2$ al plano celular, asumiendo una fase de campo de cero como estimación inicial. La aspiración del algoritmo es determinar de forma iterativa la fase real del campo complejo en el plano del detector, y finalmente en el plano del objeto. En la primera iteración, el soporte del objeto es definido bien mediante el establecimiento del umbral de intensidad del campo en el plano del objeto, o bien localizando su máximo y/o su mínimo regional.
- b) el campo del interior de los soportes del objeto está conservado, mientras que los valores del campo complejo fuera de los soportes son sustituidos por un valor de fondo $U_{z_2}^{(i)}(x, y)$, como se muestra a continuación:

$$U_{-z_2}^{i+1}(x, y) = \begin{cases} m \cdot D_{-z_2}(x, y), & x, y \notin S \\ U_{-z_2}^i(x, y), & x, y \in S \end{cases} \quad \text{Eq. (7)}$$

- en la que $D_{-z_2}(x, y)$ se obtiene mediante la propagación de la raíz cuadrada de la intensidad de fondo de la imagen obtenida por el mismo dispositivo en ausencia de las células; y $m = \text{media}(U_{-z_2}^i(x, y) / \text{media } D_{-z_2}(x, y))$.
- c) el campo modificado en el plano del objeto es retropropagado al plano del detector, donde el campo tiene ahora un valor de fase distinto a cero. La amplitud de este campo es sustituida por la raíz cuadrada de la intensidad original registrada del holograma, ya que no debería permitirse ninguna modificación para la amplitud durante la convergencia para su fase. Consecuentemente, $U_0^{(i)}(x, y)$, el campo de difracción complejo en el plano del detector en la iteración I^n , puede escribirse como sigue:

$$U_0^{(i)}(x, y) = \left| U_0^{(0)}(x, y) \right| \cdot \exp(\phi_0^{(i)}(x, y)) \quad \text{Eq. (8)}$$

en la que los superíndices representan la etapa de iteración, y (x, y) representan la fase del campo después de la iteración I^n .

5

Las etapas a hasta c pueden iterarse hasta que la recuperación de fase converge. Normalmente, los resultados presentados en este artículo se obtienen con menos de 15 iteraciones, lo que es bastante similar al primer Método.

10 Comparación entre el Método 1 y el Método 2:

10

Para objetos pequeños o con una dispersión débil, tales como células sanguíneas completas o micromicroesferas, ambos métodos producen unos resultados satisfactorios con una calidad de imagen comparable. Para dichos objetos, el número de Fresnel típico de la geometría de registro es < 1 y la imagen real enfocada ocupa una pequeña fracción del área sobre la cual se disemina la imagen doble. Por lo tanto, la eliminación de la imagen del objeto en el plano de la imagen real da lugar a una pérdida de información mínima para la imagen virtual, que va a ser recuperada sin artefactos de imagen doble. Sin embargo, para objetos de interés mayores, el número de Fresnel del sistema aumenta, y la eliminación de la imagen real puede causar una excesiva pérdida de información a la imagen virtual, que puede ser más difícil de recuperar de forma iterativa. Adicionalmente, para objetos con una fuerte dispersión, los términos de autointerferencia y de interferencia cruzada pueden comenzar a dominar, de forma que el contenido holográfico de la intensidad registrada queda distorsionado. Por lo tanto, para objetos con una fuerte dispersión y/o grandes, el segundo método analizado anteriormente resulta más preferible con respecto al primer método, que requiere que los términos holográficos sean dominantes en un dispositivo con unos números de Fresnel < 10 . Por otro lado, una ventaja del primer método es que no requiere necesariamente una imagen de fondo por separado tomada antes de la inserción de la muestra en el dispositivo. Aunque también puede usarse un valor medio del campo en el plano del objeto, en ausencia de una imagen de fondo para el Método 2 (etapa b), se observó que la calidad de la imagen final resulta ser mejor con un fondo obtenido experimentalmente.

La FIG. 12 ilustra los resultados de la obtención incoherente de imágenes sin lente de una muestra de un frotis sanguíneo, que ilustra las firmas holográficas de los tres principales tipos de glóbulos blancos sanguíneos (es decir, granulocitos, linfocitos y monocitos). También se obtienen imágenes del mismo campo visual en cada caso mediante el uso de una lente de objetivo de 40x con fines comparativos (barra de escala, 20 μm). También se ilustran las amplitudes del holograma medidas, las fases del holograma recuperadas, las imágenes de la amplitud y la fase reconstruidas de un granulocito (GRA), de un linfocito (LYM) y de un monocito (MON). La FIG. 12 también ilustra una comparación entre los resultados recuperados del Método 1 (eliminación iterativa de las imágenes dobles) y del Método 2 (recuperación iterativa de la fase). RBC se refiere a los glóbulos rojos sanguíneos en la imagen de la lente con el objetivo de 40x. La firma de textura de cada holograma celular, antes de llevar a cabo la reconstrucción holográfica, puede revelar importantes variaciones entre los diferentes tipos celulares, tales como los granulocitos con respecto a los linfocitos. Esta también es una importante fuente de información digital que puede permitir potencialmente el diagnóstico de una enfermedad infecciosa (tal como la malaria) basándose, por ejemplo, en la inspección de las texturas del holograma de los glóbulos rojos sanguíneos infectados y la detección de asimetrías en la textura con respecto a una colección de glóbulos rojos sanos.

Mientras que el sistema 10, 50, 70 descrito en el presente documento es particularmente adecuado para la generación de imágenes de microobjetos, otro uso de la invención es el recuento automático de microobjetos tales como células. El sistema 10, 50, 70 puede contar el número total de células o incluso de subpoblaciones de células a partir de una población mayor. El algoritmo de identificación celular puede estar representado por una serie de etapas lineales que finalmente dan como resultado una imagen contada apropiadamente. Para comenzar, se aplica un filtro de convolución de Laplaciano de Gaussiano (LoG) a la totalidad de la imagen. Esto es una medida importante para mejorar las ubicaciones celulares con respecto al ruido de fondo, así como para distinguir cualquier célula parcialmente solapante en las muestras con una densidad elevada. Cualquier problema por gradientes de iluminación, patrones de interferencia en película fina o ruido de píxel también será mitigado mediante el filtro de LoG. Una vez completado el filtrado, los puntos de interés pueden ser extraídos a partir de la imagen filtrada mediante una operación de umbral, mediante la cual todos los valores de píxel por debajo de un cierto valor se establecerán como negro, y el resto de los píxeles se establecerán como blanco, dando como resultado una imagen binaria en blanco y negro. Sin embargo, esto introduce un problema cuando los grupos de células o las células en una proximidad muy estrecha pueden quedar unidos en el proceso de binarización. Para abordar este problema, la separación se consigue a través de la aplicación de un filtro *watershed* (línea divisoria de aguas) que dividirá dos

objetos conectados en su punto de solapamiento mínimo. En esta etapa ya se han identificado con éxito los puntos relevantes de interés en el campo visual. Es probable que dichos puntos representen poblaciones celulares objetivo; sin embargo es necesario un apropiado proceso de cribado para discriminar los puntos válidos de los puntos erróneos. Para este compromiso se aplica un conjunto de descriptores a cada potencial ubicación celular basándose en su tamaño, su circularidad, la proporción entre señal y ruido y el valor del pico local en el dominio del LoG, así como sus firmas holográficas en la fase recuperada o los dominios de amplitud medidos. Cualquier punto que no esté en un intervalo de criterios aceptables tomando como base estos parámetros será excluido del conjunto de objetos de recuento válidos. Al finalizar el proceso de exclusión, se imprimen marcadores en la imagen original y se escribe la información estadística sobre las células contadas en un archivo XML para un análisis adicional si fuera necesario.

La FIG. 13A ilustra una gráfica que compara la precisión de un recuento manual microscópico de células con el recuento holográfico automático. La precisión del recuento automatizado del método de holografía celular incoherente está ilustrada en diversas densidades de glóbulos rojos sanguíneos que varían desde < 5.000 células/ μl hasta $0,4$ millones de células/ μl . Mediante el uso de la textura bidimensional de los hologramas celulares en bruto puede conseguirse un recuento celular preciso con un índice de error $< 5\%$ a una densidad de hasta 100.000 células/ μl , mientras que las imágenes celulares reconstruidas produjeron un índice de error $< 5\%$ a una densidad celular de hasta 400.000 células/ μl .

El recuadro de la FIG. 13A también ilustra una comparación del histograma del volumen de glóbulos rojos sanguíneos que se ha estimado tomando como base las reconstrucciones holográficas con respecto a un analizador hematológico disponible comercialmente (Coulter LH750, Beckman Coulter), que mostró un ajuste muy bueno a los resultados notificados. La FIG. 13B ilustra la potencia y la precisión del proceso de reconstrucción holográfico incluso para estas soluciones celulares muy densas.

Como se ilustra en la FIG. 13A, se han demostrado unos índices de error menores del 5% para las muestras con unas densidades mayores de $3,5 \times 10^5$ células/ μl para una diversidad de muestras. Además, el algoritmo ajusta bien la escala para imágenes grandes con unas elevadas cantidades de células. Un sistema $10, 50, 70$ con unas especificaciones de *hardware* modestas, puede contar con éxito una muestra con varios miles de células en una imagen de varios megapíxeles en mucho menos de un minuto. Por ejemplo, una imagen de un megapíxel con ~ 5.000 células puede contarse en menos de tres segundos con un procesador a $2,5$ GHz.

El sistema holográfico incoherente sin lente $10, 50, 70$ permite el aislamiento del holograma individual de cualquier célula dada en una multitud de hologramas celulares. Esto está ilustrado en la FIG. 14 para tres glóbulos rojos sanguíneos a una densidad de $0,4$ millones de células/ μl . La imagen superior izquierda es el plano del holograma en bruto donde solapan todos los hologramas celulares. La imagen superior derecha muestra las imágenes celulares reconstruidas. Las imágenes inferiores ilustran las firmas holográficas de la fase y la amplitud aisladas de tres glóbulos rojos sanguíneos seleccionados que se muestran en el interior de círculos en la imagen superior derecha. Esta característica puede ser especialmente útil a la hora de tomar decisiones diagnósticas en una solución densa tomando como base las asimetrías en las texturas del holograma celular, que indican la firma de un potencial parásito tal como la malaria.

Mientras que la invención descrita en el presente documento ha sido descrita ampliamente como una plataforma de obtención de imágenes "sin lente", debería entenderse que pueden combinarse o utilizarse diversos componentes ópticos, incluyendo lentes, en los sistemas y en los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los dispositivos descritos en el presente documento pueden usar pequeñas matrices de lentes (por ejemplo, matrices de microlentes) para unos fines distintos a la obtención de imágenes. Como un ejemplo, podría usarse una matriz de lentes para aumentar la eficacia de la recolección de luz para la matriz del sensor. Dichos componentes ópticos, aunque no son necesarios para obtener imágenes de la muestra y proporcionar datos y resultados útiles relativos a la misma, todavía pueden ser empleados y están en el ámbito de la invención.

Aunque se han mostrado y descrito realizaciones de la presente invención, pueden realizarse diversas modificaciones sin desviarse del ámbito de la presente invención. Por lo tanto, la invención no debería estar limitada, excepto a las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de microscopio sin lente (10, 50, 70) para la obtención de imágenes de una muestra citológica (12) que comprende:
5 un soporte de muestras (14) configurado para contener una muestra citológica (12) que tiene objeto de interés en la misma que comprende una o más características subcelulares;
un filtro espacial (18) dispuesto a una distancia z_1 del soporte de muestras (14) en un primer lado del soporte de muestras (14), teniendo el filtro espacial (18) una apertura (20) dispuesta en el mismo configurada para permitir el paso de la iluminación; una matriz del sensor de imágenes (16) que tiene un área activa dispuesta a una distancia z_2 del soporte de muestras (14) en un segundo lado opuesto del soporte de muestras (14) en el que $z_2 \ll z_1$, y z_2 está en el intervalo de entre 0,05 mm y 2 cm, y z_1 está en el intervalo de entre 5 cm y 20 cm;
una fuente de iluminación (24) configurada para iluminar la muestra citológica (12) a través de la apertura (20), estando el filtro espacial (18) interpuesto entre la fuente de iluminación (24) y el soporte de muestras (14) y en el que no hay ninguna lente dispuesta entre la fuente de iluminación (24) y la muestra citológica (12) y no hay ninguna lente dispuesta entre el soporte de muestras y la matriz del sensor de imágenes; y, además, un procesador configurado para recibir, desde la matriz del sensor de imágenes (16), los datos de las imágenes que contienen la información de la amplitud del holograma en bruto de los objetos de interés, comprendiendo las imágenes de la amplitud del holograma, la información de la amplitud,
estando **caracterizado** dicho sistema de microscopio sin lente (10, 50, 70) **porque** dicho al menos un procesador está configurado adicionalmente para recuperar la información de la fase del holograma perdida de los sujetos de interés y devolver una imagen reconstruida con calidad de microscopio de los sujetos de interés con una resolución subcelular y **porque** tiene un campo visual igual al área activa de la matriz del sensor de imágenes (16) mediante el uso de la información de la fase del holograma recuperada y de la información de la amplitud.
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el soporte de muestras (14) está dispuesto en un dispositivo de comunicación móvil (30) y configurado para contener una muestra citológica (12), estando dimensionado el dispositivo de comunicación móvil (30) para una portabilidad de bolsillo.
3. El sistema de la reivindicación 2, en el que el dispositivo de comunicación móvil (30) está configurado para la transmisión inalámbrica de datos.
- 35 4. El sistema de la reivindicación 3, en el que el dispositivo de comunicación móvil (30) comprende un teléfono móvil o un asistente personal digital.
5. El sistema de la reivindicación 3, en el que el filtro espacial (18) y la fuente de iluminación (24) están contenidos con un alojamiento (40) configurado para que sea extraíble del dispositivo de comunicación móvil (30).
- 40 6. El sistema de la reivindicación 1, en el que el soporte de muestras (14) comprende un dispositivo de microfluído.
7. El sistema de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
45 un prisma (56) interpuesto entre el filtro espacial (18) y el soporte de muestras (14);
una fuente de iluminación fluorescente (54) configurada para iluminar la muestra citológica (12) a través del prisma (56), en el que sustancialmente toda la iluminación fluorescente incidente es reflejada a través de reflexión interna total.
- 50 8. El sistema de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente un filtro óptico interpuesto entre el soporte de muestras (14) y la matriz del sensor de imágenes (16).
9. El sistema de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una placa frontal óptica.
- 55 comprende una pluralidad de fibras ópticas, fibras interpuestas entre el prisma (56) y el filtro óptico.
10. El sistema de la reivindicación 1, en el que la matriz del sensor de imágenes (16) está contenida en un dispositivo de comunicación móvil (30) y la fuente de iluminación (24) está dispuesta en una extensión configurada para ser fijada al dispositivo de comunicación móvil (30) adyacente a la matriz del sensor de imágenes.

(16).

11. Un método de campo amplio para la obtención de imágenes microscópicas de una muestra citológica (12) con calidad de microscopio y resolución subcelular de uno o más objetos de interés que comprende:

5

la iluminación del lado frontal de un soporte de muestras (14) configurado para contener una muestra citológica (12) con una fuente de iluminación (24) que emite luz al menos parcialmente incoherente, pasando la luz al menos parcialmente incoherente a través de una apertura (20) antes de iluminar la muestra citológica (12), en el que la apertura (20) está dispuesta a una distancia z_1 del soporte de muestras (14) y hay dispuesta una matriz del sensor de imágenes (16) que tiene un área activa a una distancia z_2 de una zona posterior del soporte de muestras (14), y en el que $z_2 \ll z_1$, y z_2 está en el intervalo de entre 0,05 mm y 2 cm, y z_1 está en el intervalo de entre 5 cm y 10 cm; y en el que no hay ninguna lente dispuesta entre la fuente de iluminación (24) y la muestra citológica (12) y no hay ninguna lente dispuesta entre el soporte de muestras (14) y la matriz del sensor de imágenes (16);

10

15

la obtención de uno o más fotogramas de imágenes a partir de la matriz del sensor de imágenes (16), conteniendo el uno o más fotogramas de las imágenes, las imágenes de la amplitud del holograma en bruto de los objetos de interés;

caracterizado porque dicho método de campo amplio comprende adicionalmente:

20

el procesado de uno o más de los fotogramas de las imágenes que contienen las imágenes de amplitud del holograma en bruto de los objetos de interés con un procesador para la recuperación de la información de la fase del holograma perdida de los objetos de interés; y la obtención, a partir del procesador, de las imágenes reconstruidas de los objetos de interés tomando como base, al menos en parte, las imágenes de la amplitud del holograma en bruto y la información de la fase del holograma perdida, en el que las imágenes reconstruidas tienen una resolución subcelular y un campo visual igual al área activa de la matriz del sensor de imágenes (16).

25

12. El método de la reivindicación 11, en el que el al menos un procesador compara uno o más de los fotogramas de las imágenes con una colección, y tomando como base al menos en parte dicha comparación, identifica una o más células, orgánulos, partículas contenidos en la muestra (12).

30

13. El método de la reivindicación 11, en el que el al menos un procesador devuelve un recuento de células de un tipo en concreto que tienen una característica en concreto.

35

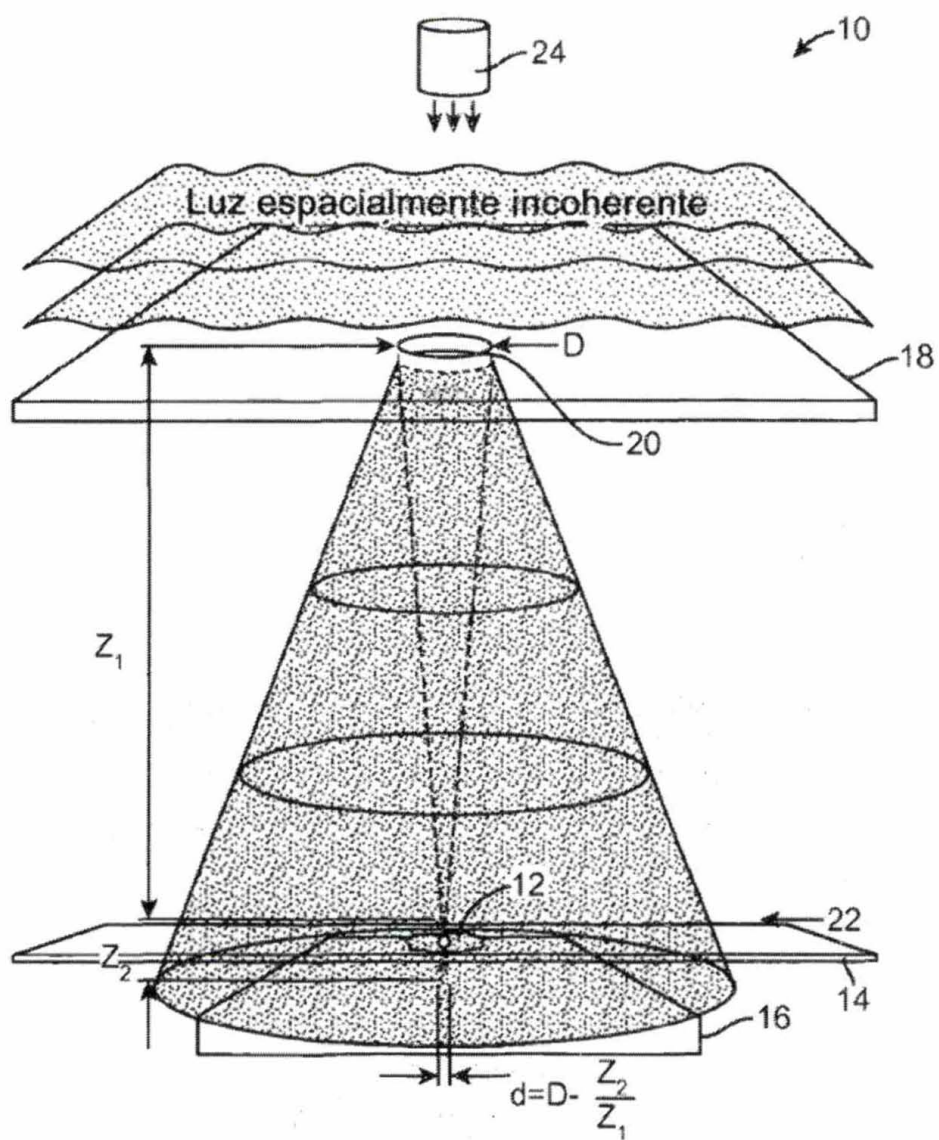


FIG. 1

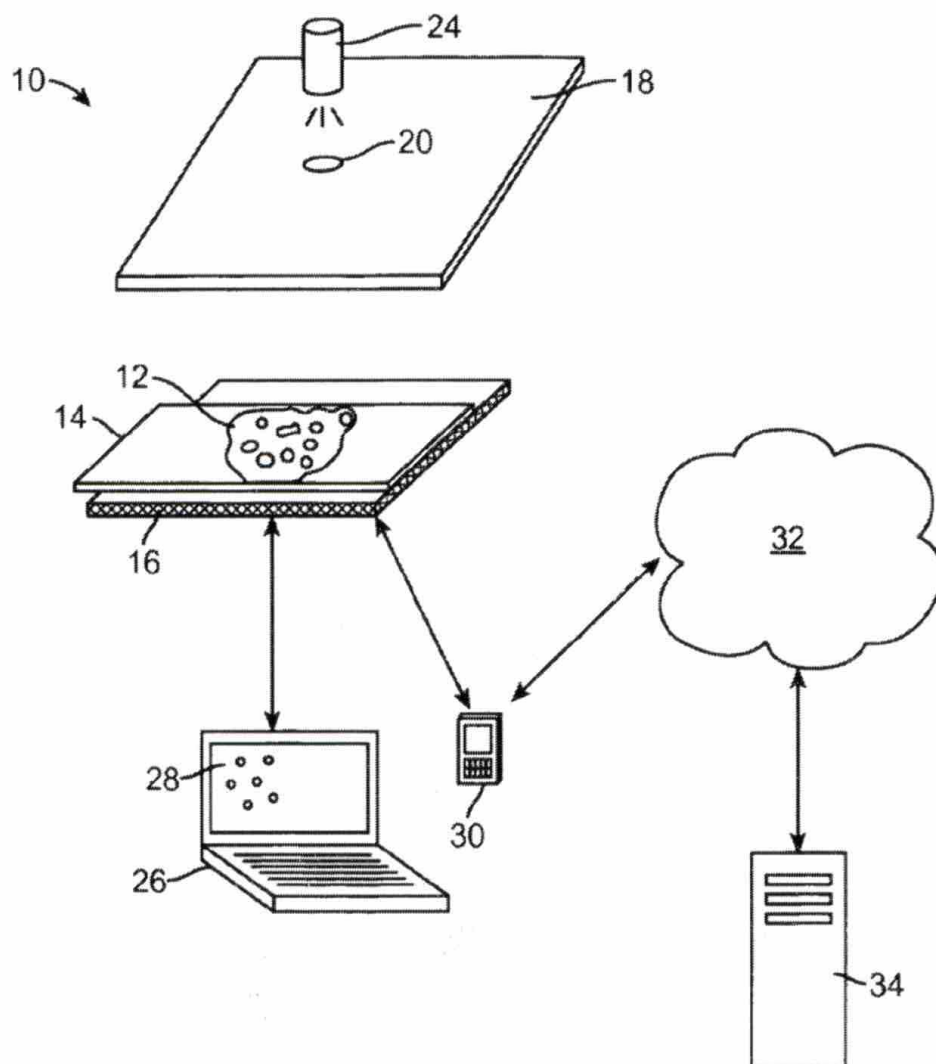


FIG. 2

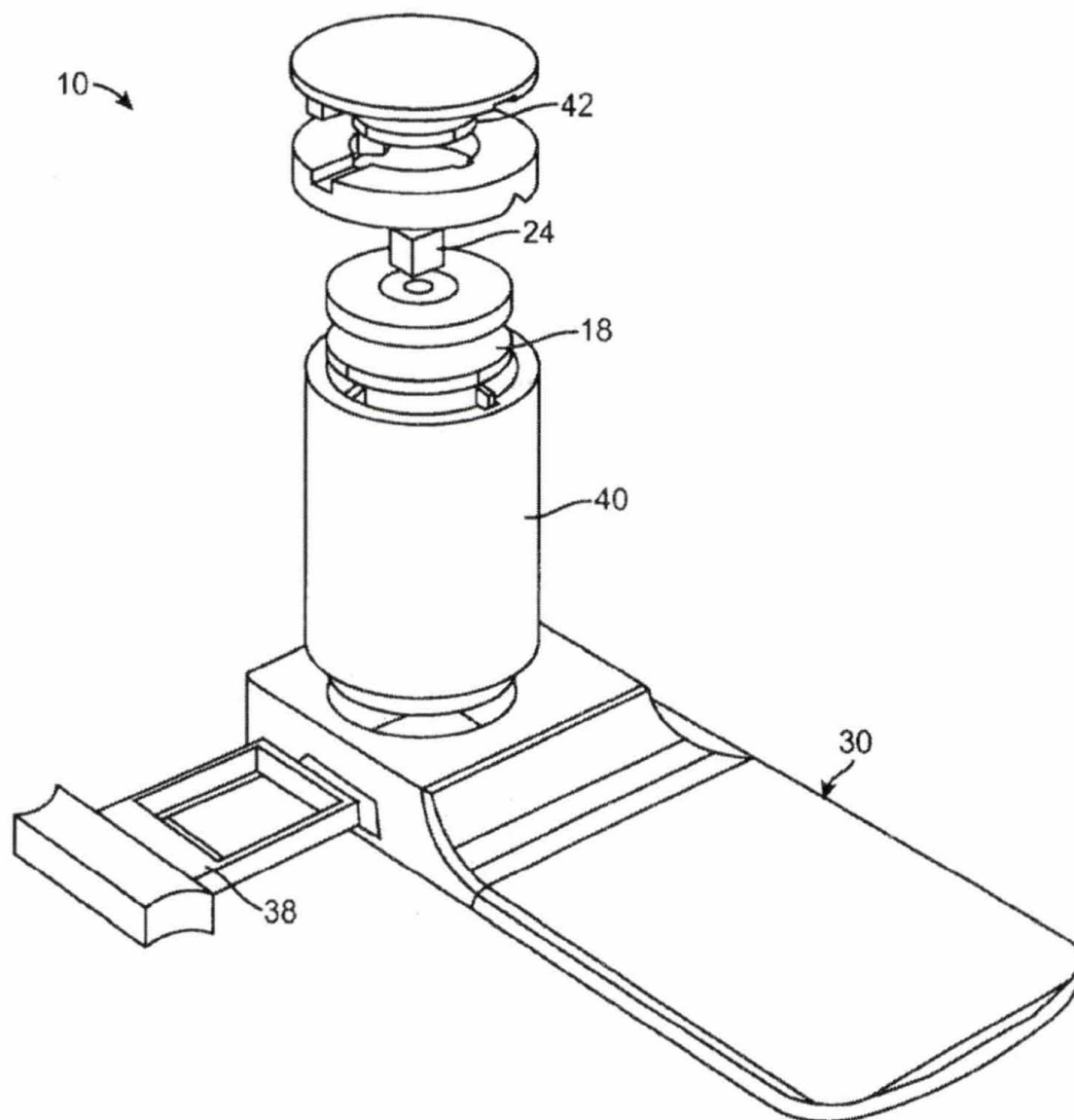


FIG. 3

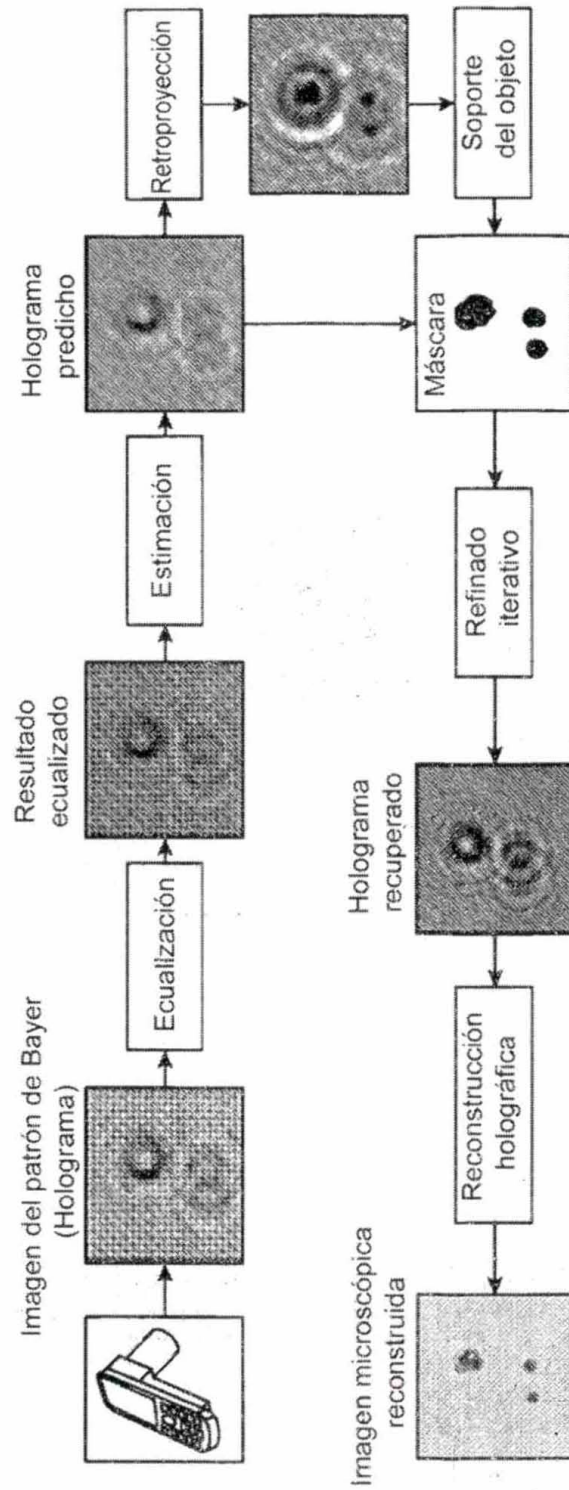


FIG. 4

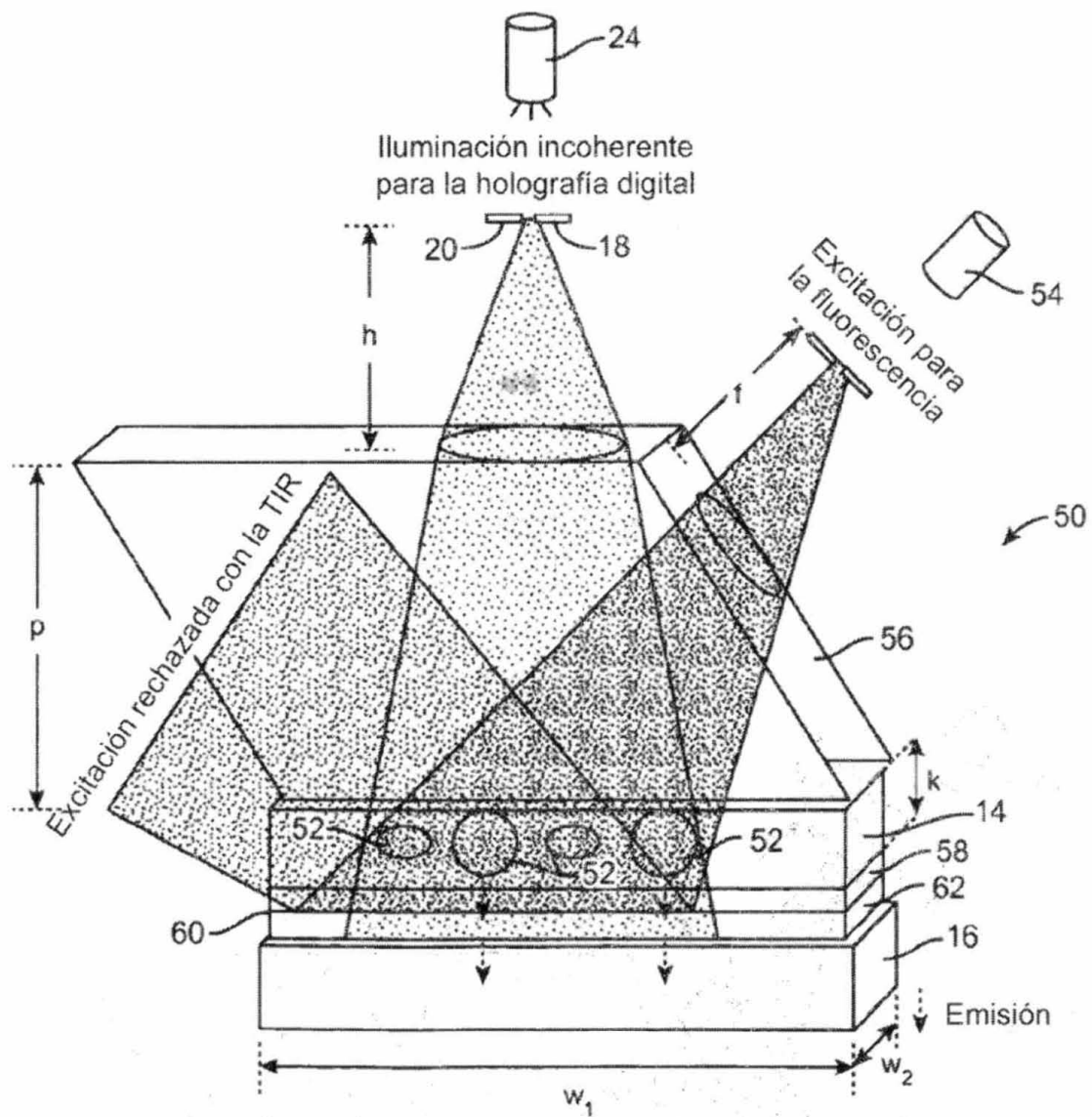


FIG. 5

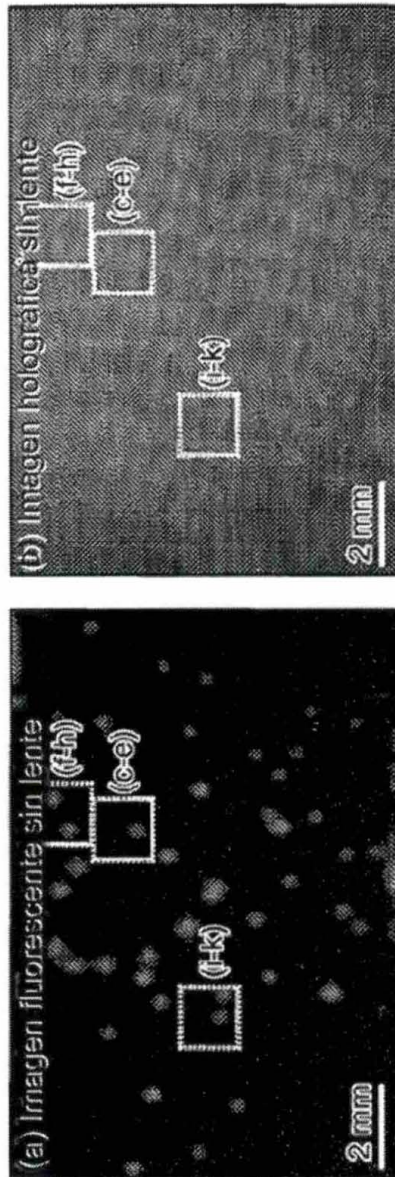


FIG. 6a

FIG. 6b

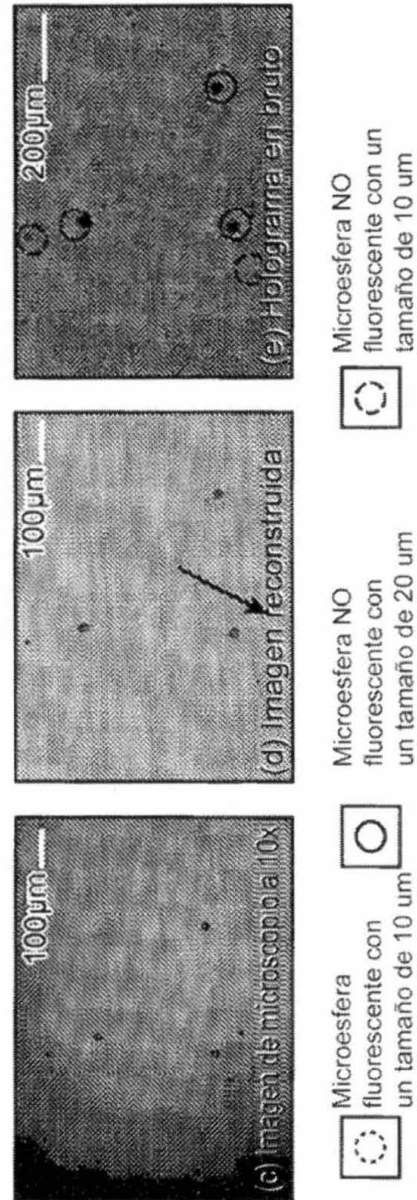


FIG. 6c

FIG. 6d

FIG. 6e

Microesfera fluorescente con un tamaño de 10 μm

Microesfera NO fluorescente con un tamaño de 20 μm

Microesfera NO fluorescente con un tamaño de 10 μm



FIG. 6f

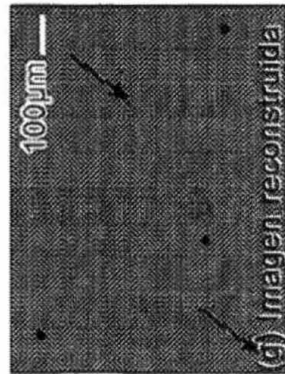


FIG. 6g



FIG. 6h



FIG. 6i

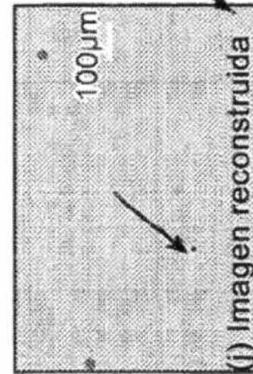


FIG. 6j



FIG. 6k

 Microesfera fluorescente con un tamaño de 10 µm
  Microesfera NO fluorescente con un tamaño de 20 µm
  Microesfera NO fluorescente con un tamaño de 10 µm

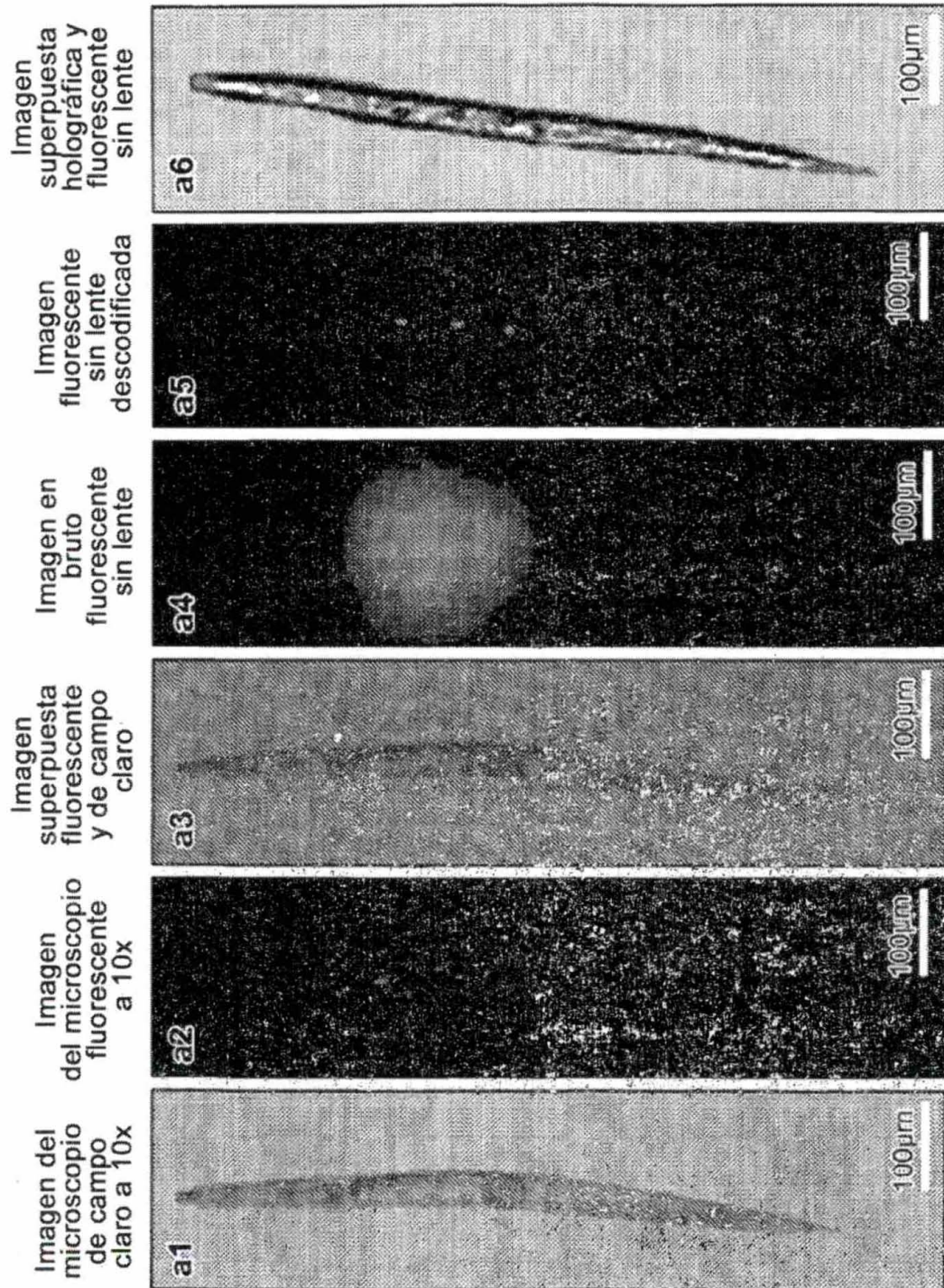


FIG. 7(a1) FIG. 7(a2) FIG. 7(a3) FIG. 7(a4) FIG. 7(a5) FIG. 7(a6)

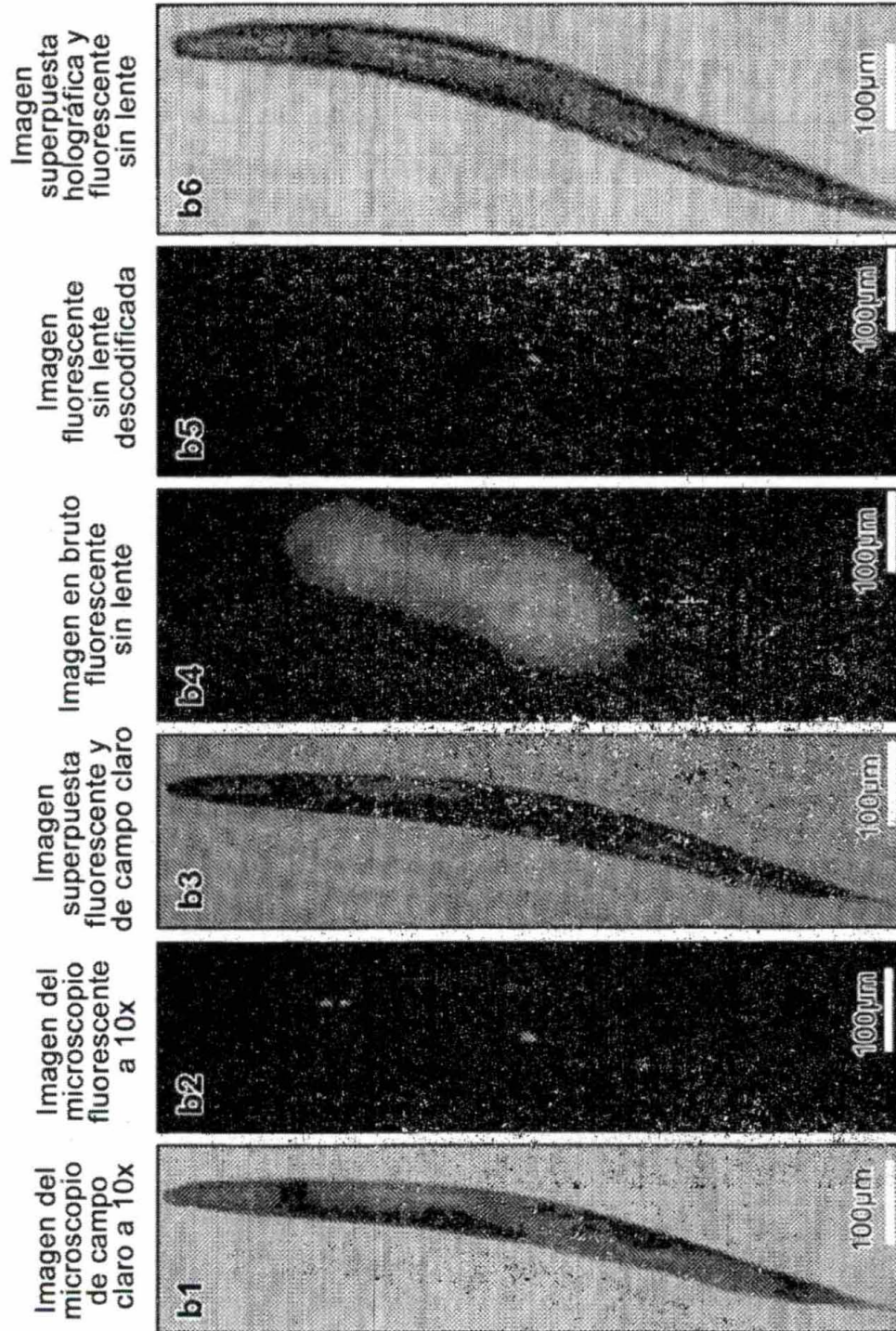


FIG. 7(b1) FIG. 7(b2) FIG. 7(b3) FIG. 7(b4) FIG. 7(b5) FIG. 7(b6)

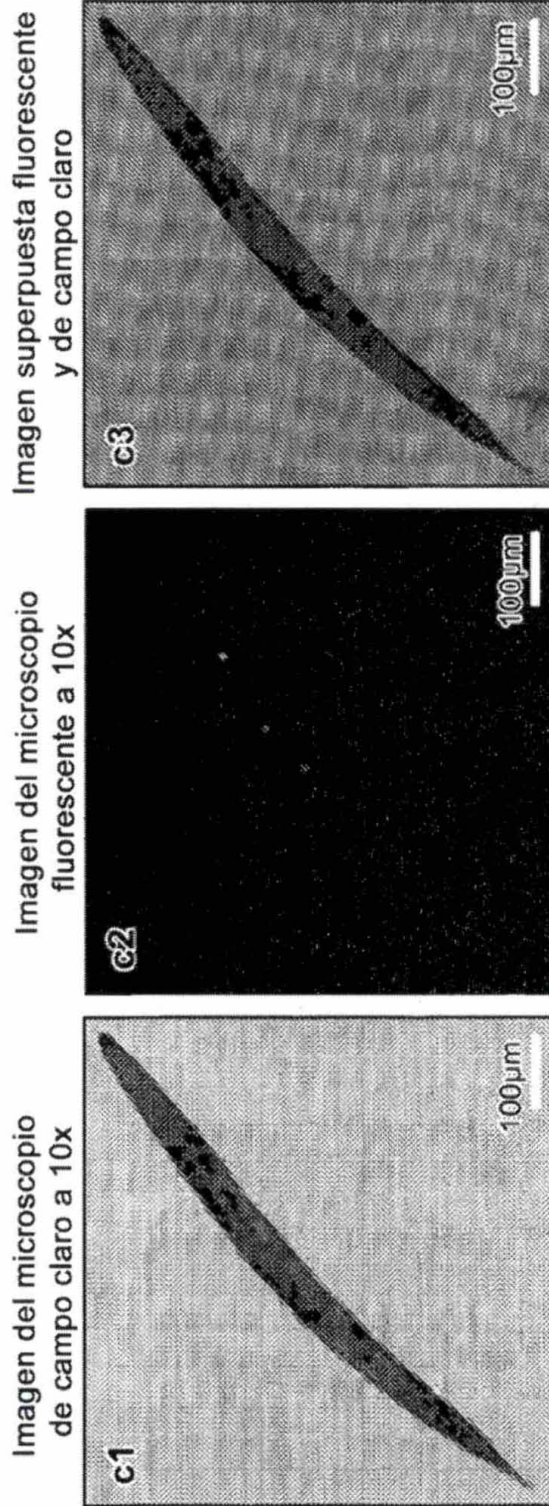


FIG. 7(c1)

FIG. 7(c2)

FIG. 7(c3)



FIG. 7(c4)

FIG. 7(c5)

FIG. 7(c6)

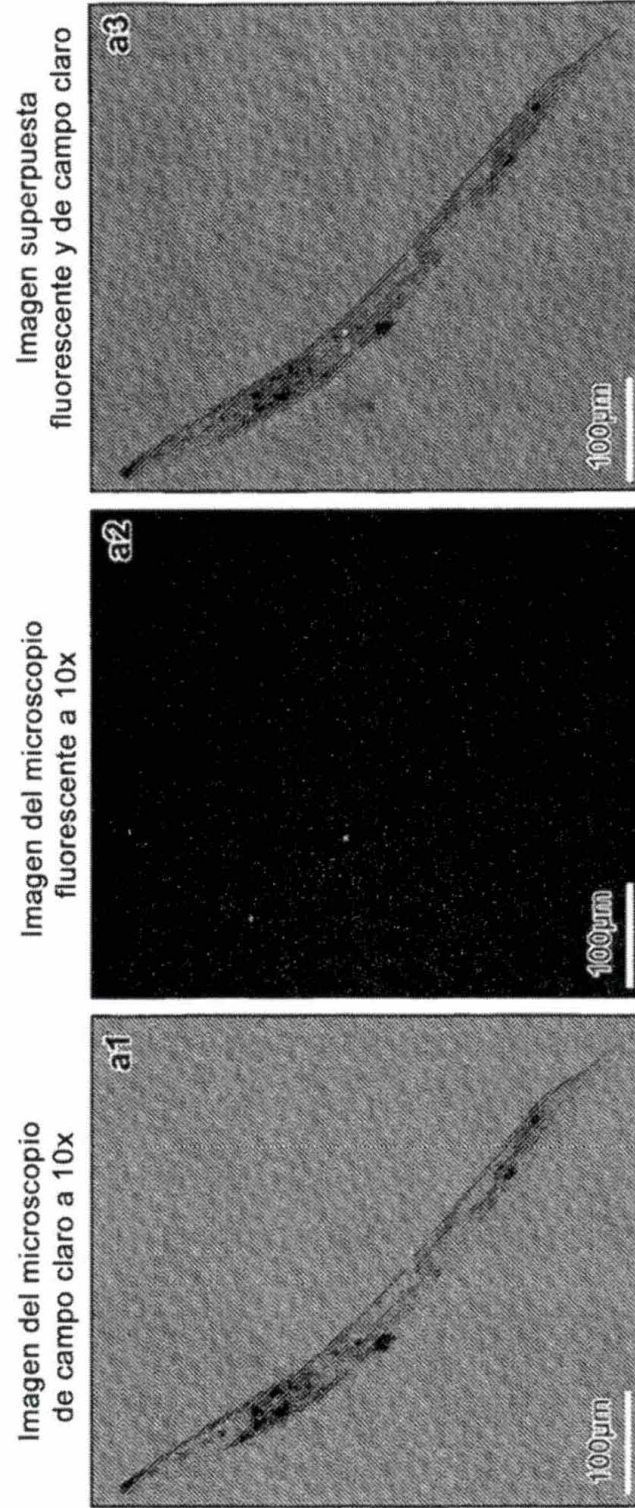


FIG. 8(a1)

FIG. 8(a2)

FIG. 8(a3)

Imagen en bruto
fluorescente sin lente

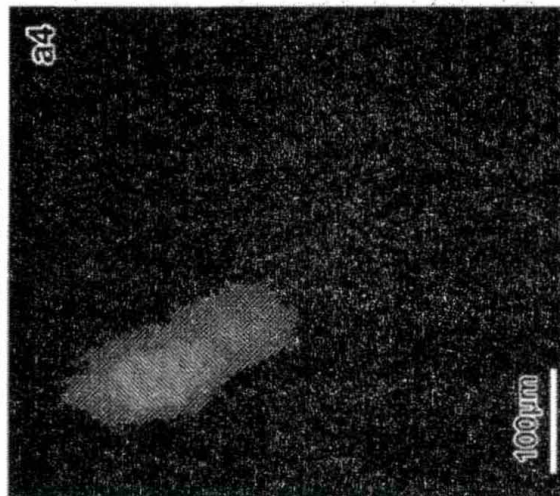


FIG. 8(a4)

Imagen fluorescente
sin lente descodificada



FIG. 8(a5)

Imagen superpuesta holográfica
y fluorescente sin lente

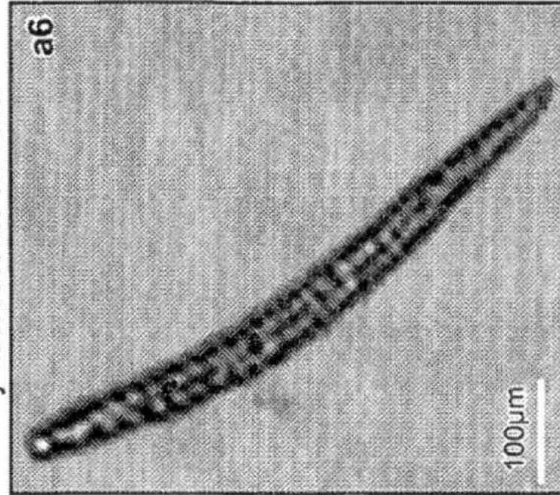


FIG. 8(a6)

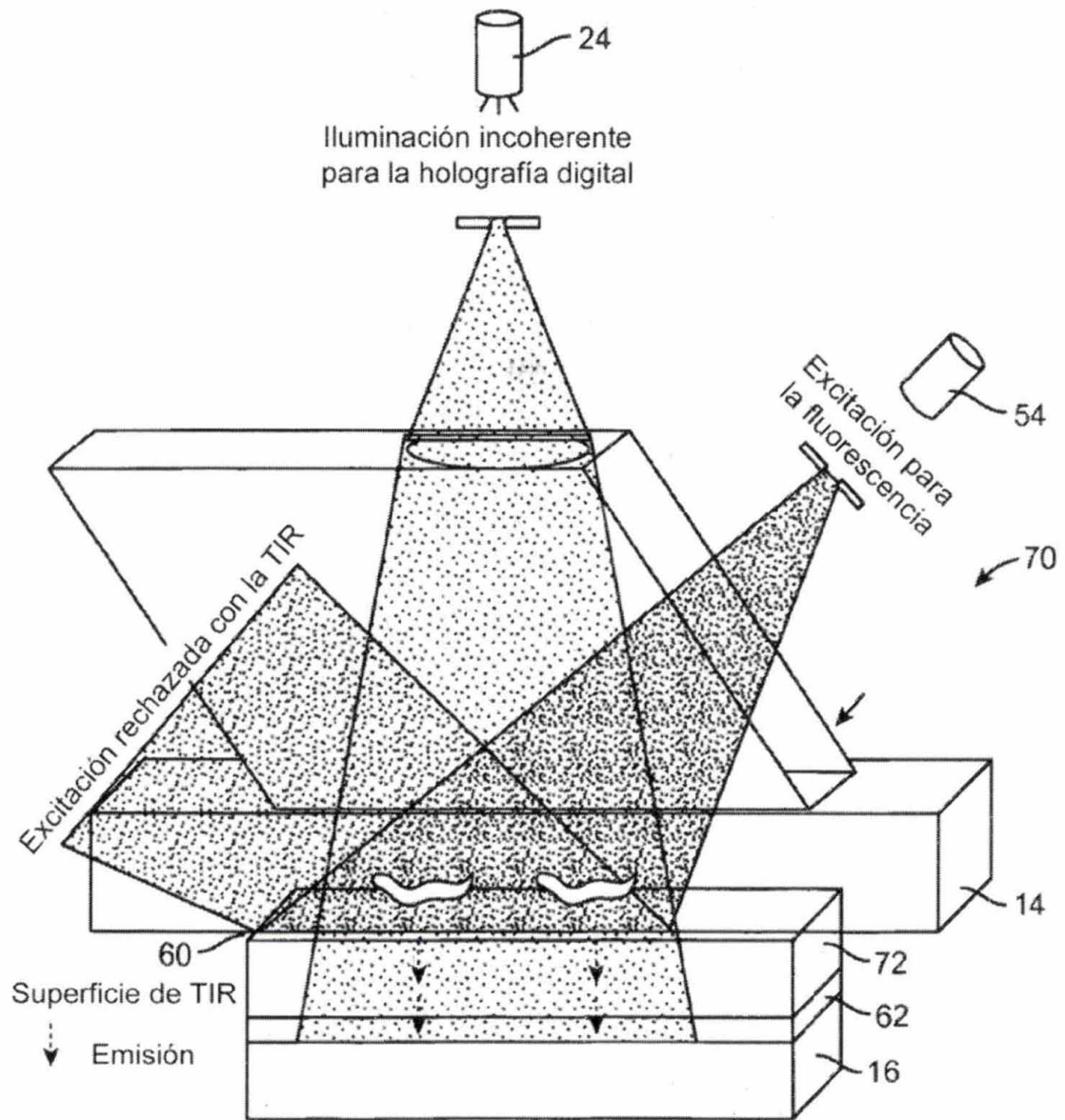


FIG. 9

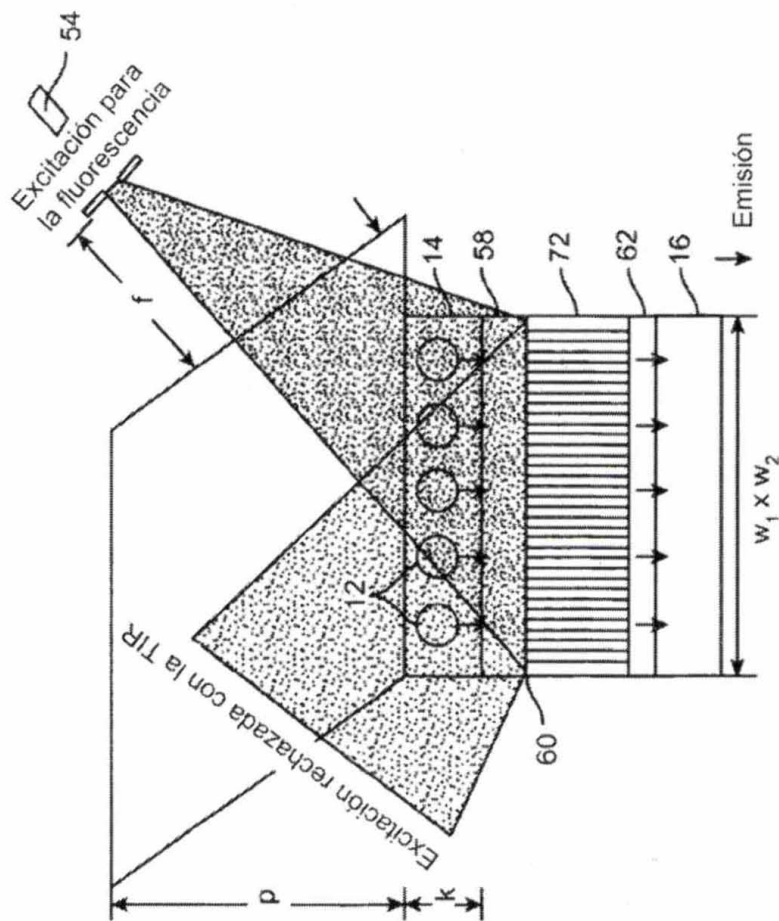


FIG. 10A

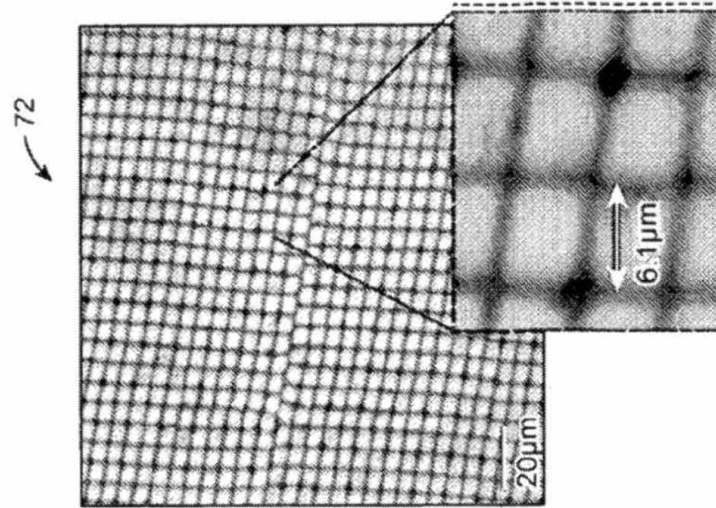


FIG. 10B

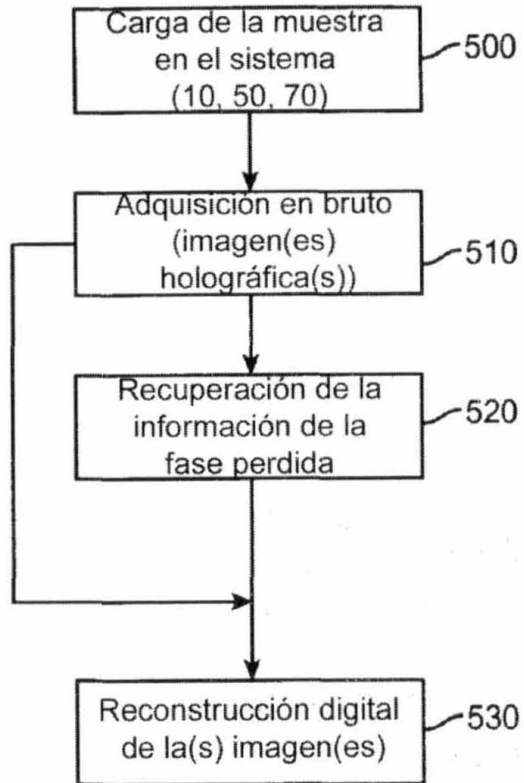


FIG. 11

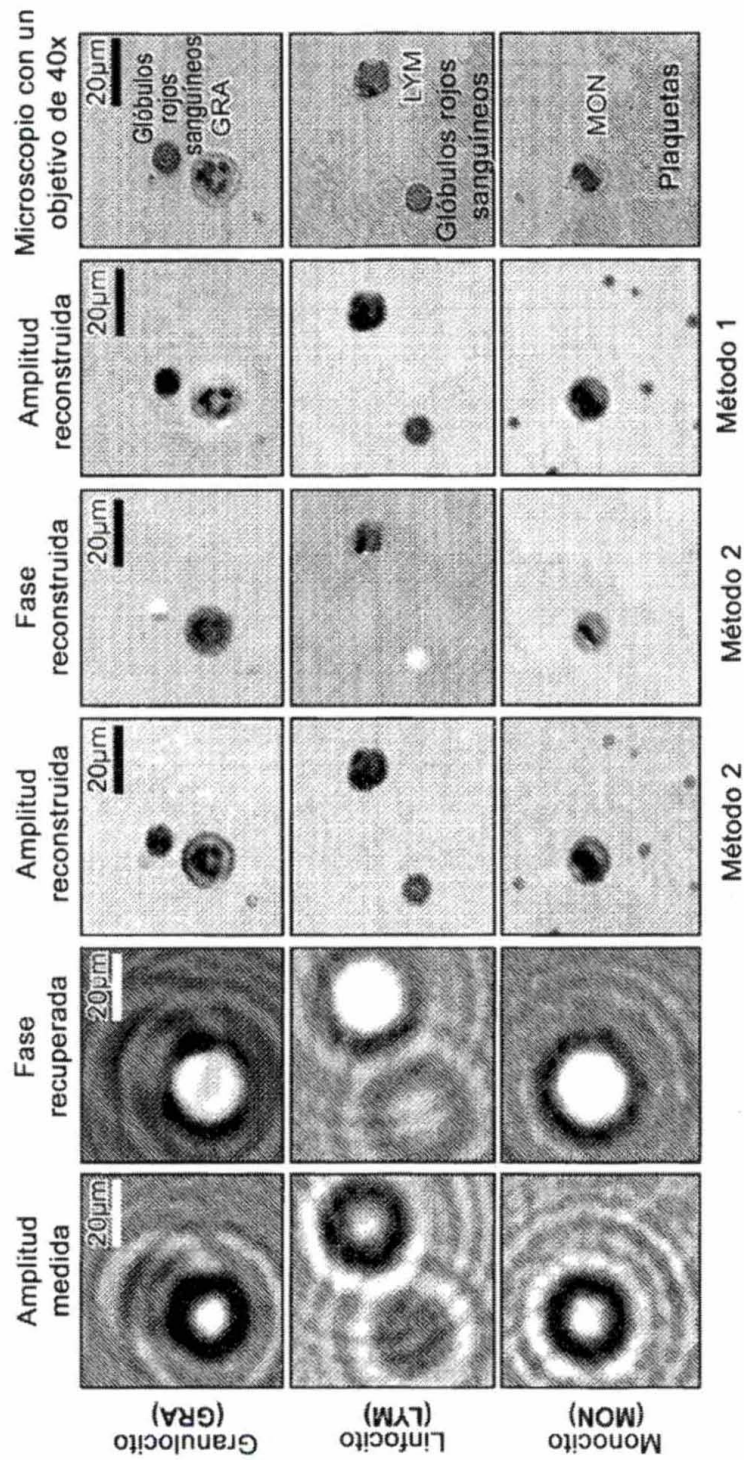


FIG. 12

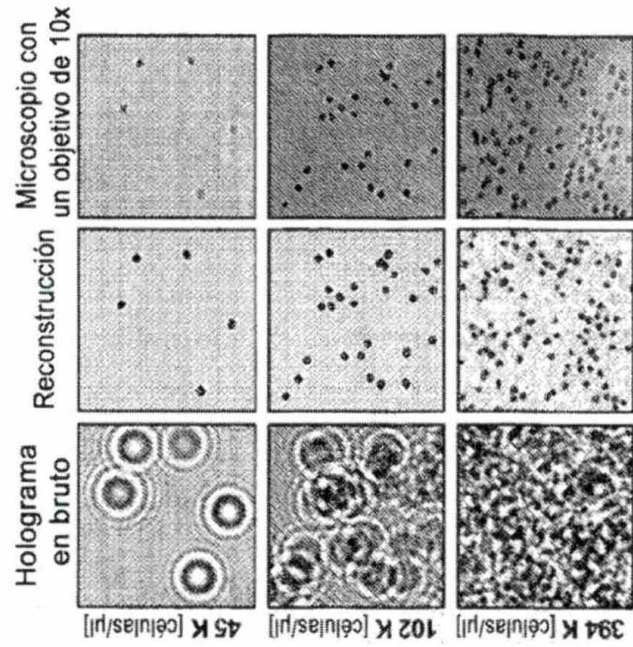


FIG. 13B

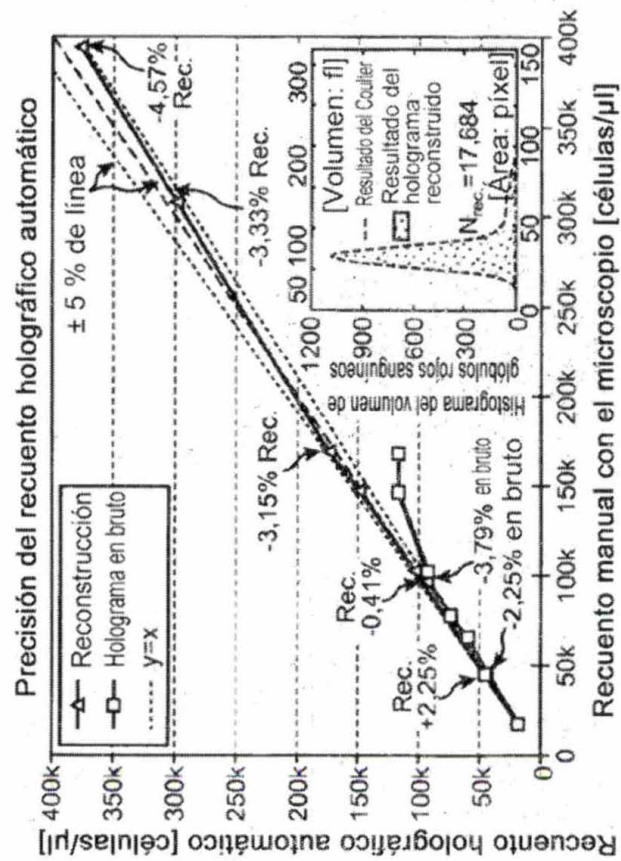


FIG. 13A

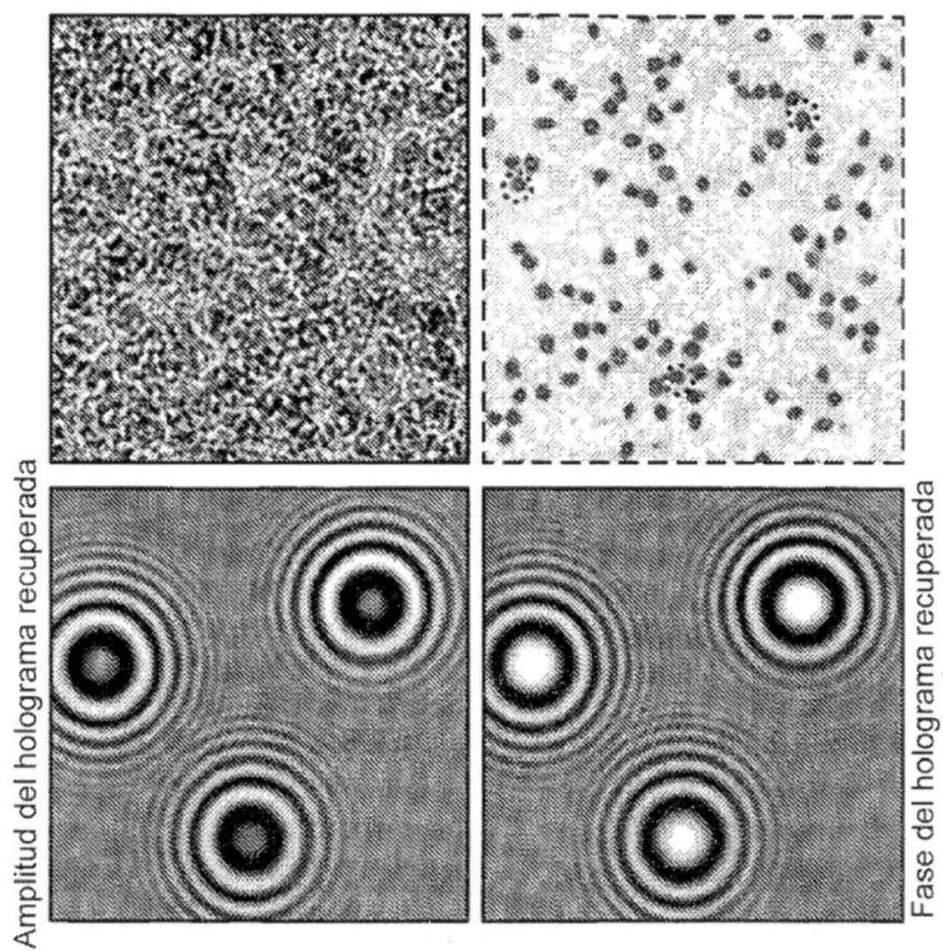


FIG. 14