

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 784**

21 Número de solicitud: 201300750

51 Int. Cl.:

G03H 1/26 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.08.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.06.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)
Avenida Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA MONREAL, Francisco Javier;
MICÓ SERRANO, Vicente y
SANZ SABATER, Martín**

54 Título: **Método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples longitudes de onda, microscopio holográfico sin lentes en línea basado en múltiples longitudes de onda y programa de ordenador**

57 Resumen:

Método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples longitudes de onda, microscopio holográfico sin lentes en línea basado en múltiples longitudes de onda y programa de ordenador.

El método comprende:

- iluminar, de manera simultánea, un objeto (O) con luz divergente que incluye tres o más longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 - \lambda_3 + \dots$);
- registrar un holograma múltiple del objeto iluminado (O); y

- obtener, por reconstrucción digital, una imagen holográfica compuesta mediante un procesado digital de la información multiespectral incluida en el holograma múltiple relativa a las tres o más longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que incluye realizar una mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros correspondientes a cada longitud de onda.

El microscopio está adaptado para implementar el método del primer aspecto.

El programa de ordenador implementa la reconstrucción digital del método de la invención.

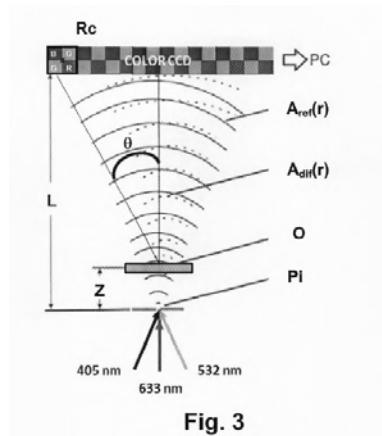


Fig. 3

DESCRIPCIÓN

Método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples longitudes de onda, microscopio holográfico sin lentes en línea basado en múltiples longitudes de onda y programa de ordenador

5

Sector de la técnica

La presente invención concierne, en general y en un primer aspecto, a un método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples longitudes de onda, y más en particular a un método que comprende registrar
10 simultáneamente, para todas dichas múltiples longitudes de onda, un holograma múltiple policromático, y reconstruir digitalmente una imagen holográfica compuesta a partir de la información multiespectral incluida en dicho holograma múltiple policromático.

Un segundo aspecto de la invención concierne a un microscopio holográfico sin lentes en línea basado en la emisión y detección de múltiples longitudes de onda por
15 parte de una fuente de luz policromática, que comprende unos medios de registro y unos medios de procesamiento que permiten, respectivamente, el registro simultáneo de un holograma múltiple policromático y la reconstrucción digital de una imagen holográfica compuesta a partir de la información multiespectral incluida en el mismo.

Un tercer aspecto de la invención concierne a un programa de ordenador que implementa la reconstrucción digital del método del primer aspecto.
20

Estado de la técnica anterior

El grupo del profesor Kreuzer ([2][3]) propuso un sistema de holografía digital en
25 línea, comercializado por la empresa Resolution Optics, basado en el principio de la holografía inventado por Gabor en 1948 ([10]), en el cual, esencialmente, un haz de luz monocromático coherente ilumina un objeto y el patrón de difracción generado por dicho objeto llega al plano de registro tras propagarse una determinada distancia. En la idea original propuesta por Gabor, la iluminación empleada estaba compuesta por
30 haces de electrones y en el plano de registro se colocaba una placa fotográfica para registrar el patrón difractado.

Tras registrar el holograma, hay que proceder a su reconstrucción. Para ello, el sistema experimental es básicamente el mismo utilizado para el registro (salvo pequeños cambios) con la salvedad de que se elimina el objeto. De este modo, solo
35 hay haz de iluminación que incide sobre la placa fotográfica y que, a su salida, genera una doble imagen del objeto. Ambas imágenes son idénticas pero invertidas y

conjugadas una con respecto a la otra, y se conocen con el nombre de imagen real y virtual o imágenes gemelas de la holografía.

La existencia de dos imágenes gemelas supone, principalmente, un problema asociado al ruido de la imagen reconstruida. Es decir, al realizar la reconstrucción del
5 holograma, la imagen real estará superpuesta con una imagen desenfocada o patrón de difracción procedente de la imagen virtual. Y esto implica cierto ruido de fondo sobre la imagen real, que es la imagen del objeto que queremos analizar. No obstante, existen algunos métodos de supresión de la imagen virtual (método de “phase-shifting”, algoritmos de iteración entre imágenes gemelas, etc.) así como de minimización de su
10 efecto (coherencia parcial, post-procesado digital, etc.). En cualquier caso, la existencia de las imágenes gemelas es un problema que existe en los sistemas holográficos en línea que, dependiendo del caso, podrá ser más o menos crítico.

Matemáticamente, el principio de Gabor se enuncia del siguiente modo. Una onda esférica de longitud de onda λ que emana de una fuente puntual o “pinhole” de
15 iluminación con un diámetro del orden de la longitud de onda de la iluminación empleada, ilumina un objeto típicamente situado a una distancia corta (pocas miles de longitudes de onda) del “pinhole” de iluminación. De este modo, el objeto así iluminado produce un patrón de difracción con un aumento grande sobre una pantalla situada a distancia larga (decenas de milímetros) en comparación con la distancia entre el
20 “pinhole” y el objeto. El aumento M proporcionado puede calcularse como:

$$M = \frac{L}{Z} \quad (1)$$

siendo L la distancia que hay entre el “pinhole” de iluminación y la pantalla de detección, y Z la distancia existente entre el “pinhole” de iluminación y el objeto. Estas distancias pueden identificarse en la Figura 1, donde los diferentes elementos del microscopio se
25 han referenciado como: Pi: “pinhole”, R: pantalla de registro holográfico y O: muestra u objeto iluminado.

Si se llama $A(\vec{r})$ a la amplitud de la onda de iluminación que llega al plano del objeto en un instante dado, siendo \vec{r} el vector que indica la posición espacial, y suponiendo emisión constante dentro del cono de iluminación proporcionado por el
30 “pinhole” de iluminación, dicha onda de iluminación puede subdividirse justo en el plano posterior al objeto y en aproximación de Gabor como suma de dos contribuciones: $A(\vec{r}) \cong A_{\text{ref}}(\vec{r}) + A_{\text{dif}}(\vec{r})$. Es decir, como suma de una onda de referencia que no se ve alterada por el objeto y sigue su propagación como si no hubiese objeto ($A_{\text{ref}}(\vec{r}) = \exp(ikr)/r$, en teoría escalar de la difracción siendo $k=2\pi/\lambda$ el número de onda) más una
35 componente difractada por el objeto $A_{\text{dif}}(\vec{r})$ donde se asume que $A_{\text{dif}}(\vec{r})$ es mucho

menor que $A_{ref}(\bar{r})$. Tanto $A_{ref}(\bar{r})$ como $A_{dif}(\bar{r})$ pueden identificarse en la Figura 1. De este modo, la distribución de intensidades $I(\bar{r})$ que llega a la pantalla de detección en un instante dado puede calcularse como:

$$I(\bar{r}) = |A_{ref}(\bar{r}) + A_{dif}(\bar{r})|^2 = |A_{ref}(\bar{r})|^2 + |A_{dif}(\bar{r})|^2 + A_{ref}^*(\bar{r})A_{dif}(\bar{r}) + A_{ref}(\bar{r})A_{dif}^*(\bar{r}) \quad (2)$$

5 Los cuatro términos presentes en la ecuación 2 pueden identificarse como:

- Término 1: $|A_{ref}(\bar{r})|^2$ es la intensidad procedente del fondo de iluminación, es decir, de la onda no alterada por el objeto y supone un fondo de intensidad sobre la imagen registrada en la pantalla de detección.
- Término 2: $|A_{dif}(\bar{r})|^2$ es la intensidad procedente de la difracción producida por el objeto.
- Término 3: $A_{ref}^*(\bar{r})A_{dif}(\bar{r})$ es el producto entre las amplitudes complejas de la onda de referencia complejo-conjugada y la componente procedente de la difracción del objeto.
- Término 4: $A_{ref}(\bar{r})A_{dif}^*(\bar{r})$ es el producto entre las amplitudes complejas de la onda de referencia y la componente complejo-conjugada procedente de la difracción del objeto.

Los términos 1 y 2 se corresponden con fondos de luz sobre el holograma registrado mientras que los términos 3 y 4 son términos interferenciales y tienen que ver con las imágenes real y virtual, respectivamente, cuando se realiza la reconstrucción del holograma.

Para llegar a la ecuación 2 ha sido necesario asumir que la onda originada por el objeto es mucho menor que la onda de referencia: $A_{dif}(\bar{r}) \ll A_{ref}(\bar{r})$. Solo bajo esta aproximación, es posible llegar a la ecuación 2 donde se dice que la holografía domina el proceso y es posible realizar reconstrucción holográfica del objeto. Esta situación se da cuando el objeto solo apantalla o bloquea una pequeña fracción de la luz sobre la pantalla de registro. Es lo que se suele conocer como aproximación de objeto poco difractivo y se produce cuando el objeto es esencialmente transparente o, incluso siendo opaco, presenta una baja proporción de zonas opacas en comparación con las transparentes. En caso contrario, no se puede asegurar que se está en régimen holográfico y no es posible realizar reconstrucción holográfica del objeto.

La adaptación comercial en el rango óptico de la idea de Gabor fue propuesta por Kreuzer y colaboradores en 2001 ([11]). En el sistema de Kreuzer, básicamente,

reemplazan la placa fotográfica del sistema de Gabor por un sensor digital (cámara CCD o sensor CMOS) y la iluminación de haces de electrones por luz visible.

Los contras del sistema Kreuzer son los mismos que en el concepto de Gabor, sin embargo existen numerosas ventajas derivadas del empleo de un sensor digital en la captura de los hologramas. Así por ejemplo, lo primero que se puede hacer es construir una imagen de contraste holográfica simplemente sustrayendo el fondo de iluminación del holograma registrado cuando si hay objeto. Esto supone una imagen de calibración inicial donde, sin presencia de objeto, se registra la imagen del fondo de referencia $A_{ref}(\bar{r})$ y su intensidad se resta de la intensidad proporcionada por el holograma registrado en presencia de objeto. Esto supone restar el término 1 directamente de la ecuación 2:

$$I'(\bar{r}) = |A_{ref}(\bar{r}) + A_{dif}(\bar{r})|^2 - |A_{ref}(\bar{r})|^2 = |A_{dif}(\bar{r})|^2 + A_{ref}^*(\bar{r})A_{dif}(\bar{r}) + A_{ref}(\bar{r})A_{dif}^*(\bar{r}) \quad (3)$$

De este modo, las imágenes holográficas reconstruidas digitalmente poseen una contribución menos y, por lo tanto, menor ruido.

Obviamente, la imagen registrada por el sensor digital no es una imagen enfocada del objeto sino la interferencia de un patrón de difracción del objeto (es decir, algo desenfocado) con un haz de referencia de fondo. Dicho patrón desenfocado debe enfocarse digitalmente y para ello es fundamental que se esté en el régimen holográfico, es decir, objetos poco difractivos. Existen diferentes métodos para realizar el enfoque digital con diferentes características dependiendo de si se está en un sistema de alta o baja apertura numérica, de larga o corta distancia de propagación, etc. En cualquier caso, se trata de algoritmos de dominio público salvo en la patente de Kreuzer ([2]) donde sí se especifica un método de cálculo mediante una implementación rápida de la transformada de Kirchhoff-Helmholtz que permite evaluar $A_{dif}(\bar{r})$ de manera exacta sin aproximaciones para diferentes distancias de propagación con el fin de construir una imagen 3D del objeto.

Sin embargo y como paso previo al enfoque digital, se suele realizar una corrección de la intensidad de la iluminación láser. Este paso sirve para homogenizar la intensidad en todo el holograma compensando las posibles variaciones de intensidad entre centro y periferia ocasionadas por una iluminación láser no constante. Simplemente implica una re-normalización de la intensidad que se calcula como:

$$I''(\bar{r}) = \frac{I(\bar{r}) - I'(\bar{r})}{\sqrt{I'(\bar{r})}} \quad (4)$$

Cuando en holografía se habla de reconstrucción se quiere decir que se obtiene la distribución compleja de amplitudes $A_{dif}(\bar{r})$ a partir del holograma. La visualización de

$A_{\text{dif}}(\vec{r})$ en un plano 2D, es decir, perpendicular al eje óptico, proporciona o es equivalente a una única imagen enfocada del objeto (algo similar a lo que proporciona un microscopio convencional). Pero gracias a la holografía, es posible generar una pila de imágenes 2D para diferentes distancias de propagación a partir de un único
5 holograma registrado, de tal manera que se pueden combinar para proporcionar una imagen 3D del objeto que mejora su visualización.

Así pues, el algoritmo digital realizado por el sistema de Kreuzer puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Registro del holograma digital (ecuación 2).
- 10 2. Registro del fondo de iluminación sin objeto para generar holograma de contraste (ecuación 3).
3. Corrección de la intensidad según la iluminación láser (ecuación 4).
4. Reconstrucción numérica (algoritmo de propagación digital) a partir de la intensidad proporcionada por la ecuación 4 para enfocar el objeto.

15 Este procesado no permite eliminar la imagen virtual (solo minimiza su efecto), y no permite obtener información multiespectral de la muestra (porque solo utiliza una longitud de onda de iluminación).

20 A continuación se citan y describen otras referencias representativas del estado de la técnica.

El documento [1] describe un microscopio holográfico en línea digital, multiespectral y compacto. Registran hologramas a diferentes longitudes de onda usando una cámara monocroma que requiere múltiples capturas secuenciales (consecutivas en el tiempo) para el registro de la información correspondiente a los
25 diferentes hologramas proporcionados por cada longitud de onda. Pensando en una configuración de tres longitudes de onda (RGB por ejemplo), este hecho merma las capacidades técnicas del microscopio ya que (al menos) triplica el tiempo de captura al necesitar tres capturas secuenciales de hologramas, no resultando útil para el análisis de eventos dinámicos rápidos. Pese a que se utilizan iluminación policromática
30 procedente de fuentes de coherencia espacial variable (láser sintonizable y LED tricolor RGB), la información relativa al color se emplea únicamente para visualización y renderizado de una imagen de la muestra en color, y para análisis multiespectral de la muestra. Teóricamente, el tener varias lambdas de iluminación permite obtener imágenes multiespectrales con información de la muestra a diferentes lambdas. Esto
35 puede ser muy útil porque permite analizar la muestra bajo diferentes lambdas (absorción selectiva multiespectral de la muestra).

La aplicación del microscopio descrito en el documento [1] se restringe a exclusivamente los canales RGB, y el procesado de las imágenes empleado se limita únicamente al enfoque digital de los hologramas capturados en serie (secuenciales en el tiempo), es decir, no se elimina la imagen virtual, ya que los autores estiman que la imagen virtual o gemela no compromete la puesta a punto del dispositivo y, por tanto, no la eliminan con el procesado.

El documento [9] propone un sistema para el análisis automatizado de semen, basado en microscopía holográfica sin lentes, mediante el cual se obtienen una serie de imágenes digitales de la muestra, a partir de las cuales se realiza una reconstrucción digital. A pesar de que se indica que el sensor de imagen (de tipo CCD o CMOS, por ejemplo) puede ser tanto monocromático como color, no se describe en [9] el registro ni la reconstrucción de hologramas de múltiples longitudes de onda, ni la utilización de una iluminación de la muestra poli-cromática, describiéndose la iluminación utilizada en [9] como una iluminación de luz visible parcialmente coherente cuasi-monocromática.

El documento [4] describe un sistema de holografía digital multicolor que emplea tres longitudes de onda y obtiene la reconstrucción de un objeto tridimensional mediante el uso de holografía digital de desplazamiento de fase ("phase-shifting digital holography"). Esencialmente, se emite simultáneamente iluminación RGB a partir de un láser de He-Cd, y dichas iluminaciones se utilizan para el registro en un solo paso de tres hologramas del objeto (uno para cada longitud de onda de iluminación) con una cámara CCD de color. Para eliminar la contribución de la imagen virtual, se introduce la técnica de desplazamiento de fase donde, para cada canal RGB, se registran 3 hologramas consecutivos. Esta técnica resulta implementada con un desplazador de fase acromática ("achromatic phase shifter") basado en polarizadores y láminas de retardo de onda. Tras el registro de los tres hologramas, éstos se combinan apropiadamente en un ordenador mediante el uso de la transformación de Fresnel basada en una integral de convolución.

La configuración del sistema de [4] no es en línea (los haces de referencia para el registro holográfico se insertan externamente), y el sistema necesita de un desplazador de fase acromática para el desplazamiento de fase que encarecen el dispositivo e inhabilita el sistema para el análisis de muestras dinámicas rápidas (ya que tres imágenes consecutivas deben ser capturadas por el CCD en color). Adicionalmente, el método algorítmico involucrado utiliza reconstrucción por transformada de Fourier debido a la presencia de los haces de referencia externos.

Los documentos [5] y [6] describen un dispositivo holográfico que se puede conectar a un dispositivo de imagen digital para que funcione como microscopio

holográfico sin lentes. Esencialmente, se trata de un dispositivo muy similar al incluido en las referencias [2] y [3] con la diferencia de la fuente emisora. En este caso, no se utiliza un "pinhole" de iluminación como fuente puntual divergente sino que se utiliza un terminal de fibra óptica acoplado a una lente de tipo GRIN ("Gradient Index"). El resto de configuración es equivalente al sistema de las referencias [2] y [3].

El documento [7] describe un microscopio holográfico digital sin lentes a color. Comentan que para evitar decodificar la multi-longitud de onda de los hologramas registrados, en algunas aplicaciones el disparo múltiple puede no ser conveniente por lo que interesa usar holografía digital a color para conseguir en un único disparo los canales cromáticos necesarios, pero no proponen hacer uso de ello en el documento [7]. Se propone el uso de tres láseres con emisión en RGB independientes que son alineados y combinados mediante tres combinadores de haz dicróicos. Los haces son focalizados mediante un objetivo de microscopio apocromático sobre un "pinhole" para producir la fuente puntual de iluminación. Usan un CCD monocromo donde, de manera secuencial (no en paralelo), se superponen los hologramas debido a las 3 longitudes de onda RGB empleadas. En esencia, se trata de un sistema análogo al incluido en las referencias [2] y [3] solo que en lugar de emplear una única longitud de onda de iluminación, aquí se emplean 3 haces RGB. El método de reconstrucción de cada holograma es análogo al incluido en las referencias [2] y [3].

Al no permitir el registro en paralelo de los 3 hologramas no se pueden registrar hologramas correspondientes a eventos más rápidos que en la configuración secuencial, tales como las muestras dinámicas.

El procesado digital para el enfoque propuesto en [7] no elimina la imagen virtual, ya que no lo consideran necesario.

Por último, el objetivo y la aplicabilidad del sistema de la referencia [7] obedecen a representación en color de la imagen holográfica y no a recuperación de fase sin imagen virtual.

El documento [8] describe un concepto/configuración de microscopio holográfico digital en línea sin lentes diferente al incluido en las referencias [1], [2], [3], [5], [6] y [7]. En esta nueva configuración, en lugar de colocar la muestra cercana a la fuente puntual de iluminación para buscar aumento de la muestra por proyección geométrica, se sitúa la muestra muy cerca del sensor digital y separada algunos mm de la fuente puntual de iluminación. Esto supone una nueva configuración experimental en línea con ventajas e inconvenientes con respecto a la configuración previa ([1], [2], [3], [5], [6] y [7]). En cuanto a las ventajas, se puede decir que se elimina la dificultad que supone colocar la muestra muy cerca de la fuente de iluminación (la cual tiene que tener unas

características muy específicas) además de incrementar enormemente el campo objeto de análisis (de 0.5x0.5 mm² a 5x5 mm², aprox.). Sin embargo, introduce una serie de limitaciones tales como ausencia de aumento óptico (prácticamente, es una configuración 1x) y resolución limitada por el tamaño de pixel del sensor digital empleado. La resolución puede mejorarse mediante un método sub-píxel basado en el registro de hologramas secuenciales cuando la fuente puntual de iluminación se va desplazando a un conjunto amplio de posiciones (36 desplazamientos como se indica en el último párrafo de la página 12477 de [8]). Además de complicar y encarecer el sistema experimental, la necesidad de desplazar la fuente de iluminación para mejorar la resolución óptica del dispositivo haciéndola similar a otros ([1], [2], [3], [5], [6] y [7]), supone la pérdida de la capacidad de analizar muestras dinámicas ya que la muestra debe ser estática durante el registro de los 36 hologramas.

En pocas palabras, la referencia [8] supone un procesado digital que se puede separar en dos partes. En la primera, se obtiene una imagen monocroma de alta resolución mediante desplazamiento sub-píxel y sin imagen virtual, utilizando una única iluminación (la verde) empleando un sensor en color.

En la segunda parte, se captura información de color iluminando con las tres longitudes de onda para poder producir un renderizado y una representación en color de la muestra analizada. Esta segunda parte del procesado digital conlleva el registro secuencial de tres hologramas, uno por longitud de onda, y para una única distancia entre la muestra y el sensor en color. Estos tres hologramas RGB de baja resolución junto con la imagen sub-píxel de alta resolución previamente obtenida, se usan para generar una imagen en color de la muestra, es decir para colorear la imagen de alta resolución obtenida para un solo color, con fines de visualización o renderizado de la muestra en color. Es decir, no se está utilizando la información de color para eliminar la imagen virtual, eliminándose ésta mediante un complejo sistema de registro de 108 hologramas secuenciales en el tiempo con complejos y precisos sistemas mecánicos de posicionamiento de componentes ópticos (fuente de luz y vidrios entre muestra y sensor digital).

No se indica en [8] que los tres hologramas RGB puedan registrarse simultáneamente, ni aplicar la captura de información de color en la que se ilumina con las tres longitudes de onda en el registro de hologramas de alta resolución, es decir que no se propone utilizar la metodología de la segunda etapa (baja resolución) en la primera etapa (alta resolución), ni, por supuesto, prescindir de la realización de la primera etapa.

Tampoco se enseña ni se sugiere, en [8], dar un mayor o menor peso a alguno de los tres hologramas RGB capturados en la segunda etapa, a la hora de colorear la imagen de alta resolución obtenida en la primera etapa.

5 Referencias:

- [1]: Lensless multispectral digital in-line holographic microscope, James P. Ryle, Susan McDonnell, John T. Sheridan, *Journal of Biomedical Optics* 16(12), 126004 (December 2011).
- 10 [2]: H. Juergen Kreuzer, Holographic microscope and method for holographic reconstruction, US 6,411,406.
- [3]: Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jürgen Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," *Applied Optics* 45, 836-850 (2006).
- 15 [4]: Jun-ichi Kato and Ichirou Yamaguchi, Tatsuki Matsumura, Multicolor digital holography with an achromatic phase shifter, August 15, 2002 / Vol. 27, No. 16 / OPTICS LETTERS.
- [5]: Stanislas Leibler; Seppe Kuehn; Zak Frentz; Doeke Hekstra, HOLOGRAPHIC MICROSCOPE, US 8,049,814 B2.
- 20 [6]: Zak Frentz, Seppe Kuehn, Doeke Hekstra, and Stanislas Leibler, "Microbial population dynamics by digital in-line holographic microscopy," *Review of Scientific Instruments* 81, 084301 (2010).
- [7]: Garcia-Sucerquia J., Color lensless digital holographic microscopy with micrometer resolution, *Opt Lett.* 2012 May 15;37(10):1724-6.
- 25 [8]: Alon Greenbaum, Alborz Feizi, Najva Akbari, and Aydogan Ozcan, "Wide-field computational color imaging using pixel super-resolved on-chip microscopy," *Optics Express* 21, 12469- 12483 (2013).
- [9]: Aydogan Ozcan, Anthony F. Erlinger, Ting-Wei Su, COMPACT AUTOMATED SEMEN ANALYSIS PLATFORM USING LENS-FREE ON-CHIP MICROSCOPY, US
- 30 2012/0148141 A1.
- [10]: D. Gabor, "Microscopy by Reconstructed Wave-Fronts," *Proc. R. Soc. Lond. A* 197, 454-487, 1949.
- [11] W. Xu, M. H. Jericho, I. A. Meinertzhagen, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holography for biological applications," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 25, 11,301–
- 35 311,2001.

Explicación de la invención

5 Aparece necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las lagunas halladas en el mismo, permitiendo obtener unas imágenes holográficas de mayor resolución y menor ruido, incluyendo las relativas a muestras dinámicas rápidas.

Con tal fin, la presente invención concierne, en un primer aspecto, a un método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples
10 longitudes de onda, que comprende, de manera en sí conocida:

- iluminar, de manera simultánea, un objeto con luz divergente que incluye al menos tres longitudes de onda;

- registrar información holográfica de dicho objeto iluminado que incluye patrones de difracción generados por dicho objeto para dichas longitudes de onda, que
15 son al menos tres; y

- obtener, por reconstrucción digital, una imagen holográfica compuesta a partir de al menos dicha información holográfica registrada.

A diferencia de los métodos conocidos en el estado de la técnica, el propuesto por el primer aspecto de la invención comprende, de manera característica, llevar a
20 cabo dicha etapa de registro de información holográfica mediante el registro simultáneo para todas dichas longitudes de onda, que son al menos tres, de un holograma múltiple policromático, y obtener dicha imagen holográfica compuesta a partir de la información multiespectral incluida en dicho holograma múltiple policromático.

Con preferencia, el método comprende realizar dicha etapa de registro
25 simultáneo en un solo disparo de la iluminación y con un único sensor digital policromático con sensibilidad a dichas tres o más longitudes de onda, para registrar un holograma múltiple policromático de única exposición, así como obtener dichos canales por separado a partir del sensor policromático, de manera que no se necesita realizar ningún escaneo de la imagen ni capturas simultáneas puesto que con un solo disparo
30 de la iluminación se capturan las información de todos los canales de iluminación, lo que reduce significativamente el tiempo de captura de la muestra y por tanto la obtención de la imagen final. Además esta ventaja resulta fundamental para el análisis de muestras dinámicas puesto que con un solo disparo (captura en paralelo) no se pierde información de la muestra lo que si ocurre cuando se realizan capturas
35 secuenciales o en serie.

Para un ejemplo de realización, dicho sensor digital tiene sensibilidad a dichas longitudes de onda, que son al menos tres, porque comprende una máscara o filtro o mosaico de celdillas con transmitancia espectral adaptada, comprendiendo el método la adaptación específica tanto de la transmitancia espectral como del número de celdillas de la máscara o filtro o mosaico a colocar sobre los píxeles del sensor digital al espectro y número de longitudes de onda elegidas para dicha etapa de iluminación simultánea, con el fin de que las celdillas transmitan en máximo el patrón de difracción proporcionado por cada una de las longitudes de onda de la iluminación. Por ejemplo, si la iluminación simultánea es una iluminación con RGB, el filtro Bayer tiene celdillas RGB con transmitancia espectral de cada celdilla adaptadas o sintonizadas a las lambdas RGB.

Para otro ejemplo de realización, para el que el sensor también dispone de dicha máscara, filtro o mosaico de celdillas, el método comprende utilizar una máscara, filtro o mosaico que carezcan de celdillas cuyas transmitancias espectrales estén adaptadas para transmitir en máximo el patrón de difracción proporcionado por al menos una de las longitudes de onda de la iluminación, pero que permitan el paso de al menos una porción de dicho patrón de difracción. Por ejemplo, si la iluminación simultánea es una iluminación con IR-R-B (usando el blu-ray como fuente de luz), es decir luz infrarroja, verde y azul, se puede utilizar un sensor digital, tal como un CCD, en color con un filtro Bayer cuyas celdillas RGB no tienen transmitancia espectral adaptada o sintonizada a las lambdas IR-R-B.

Para un ejemplo de realización preferido, el método comprende realizar únicamente dicha iluminación simultánea con dichas tres o más longitudes de onda sin requerir de iluminaciones adicionales del objeto.

El método propuesto por el primer aspecto de la invención comprende, según un ejemplo de realización preferido, para obtener dicha imagen holográfica compuesta, realizar un procesado digital de dicha información multiespectral relativa a al menos dichas tres longitudes de onda, e incluida en unos respectivos canales, que incluye realizar al menos una mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros correspondientes a cada longitud de onda.

Según un ejemplo de realización, el citado procesado digital comprende utilizar dicha información multiespectral para eliminar la contribución de la imagen virtual en la imagen holográfica compuesta.

De acuerdo con un ejemplo de realización, el holograma registrado es un único holograma multicromático o multiespectral, y el mencionado procesado digital incluye una primera etapa que comprende realizar de manera secuencial:

- una separación de la información correspondiente a cada longitud de onda incluida en dicho holograma multicromático o multiespectral, obteniendo al menos tres correspondientes hologramas monocromáticos, uno por longitud de onda o canal;

5 - una ecualización inicial o corrección de intensidad de los tres hologramas monocromáticos según la iluminación empleada para cada canal;

- una eliminación de contribuciones cruzadas no deseadas entre canales;

- una propagación digital y enfoque de cada canal por separado hasta el plano del objeto; y

10 - la citada mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros de al menos tres hologramas monocromáticos, una vez enfocados, para la generación de dicha imagen holográfica compuesta a partir de al menos tres canales.

Con el fin de obtener una imagen holográfica final de mayor calidad, en términos de resolución y ruido, preferentemente el procesado digital del método propuesto por el primer aspecto de la invención incluye también una segunda etapa de iteración de la fase que comprende realizar de manera secuencial y en bucle:

15 - una propagación digital de la imagen holográfica compuesta al plano de registro con las distancias de propagación previamente calculadas para cada canal, generando así al menos tres nuevos hologramas del objeto desenfocado;

20 - un almacenamiento o acumulación, en estos al menos tres nuevos hologramas generados, de la fase generada en la propagación digital para cada uno de los al menos tres canales, y una sustitución de la amplitud obtenida en la propagación digital para los al menos tres canales por la registrada inicialmente para cada uno de los al menos tres canales;

25 - una propagación digital de los al menos dichos tres nuevos hologramas hasta el plano del objeto, cada uno con su correspondiente distancia de propagación; y

- una mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros de los al menos tres nuevos hologramas para generar una nueva imagen holográfica compuesta que, en función de su resolución y ruido:

30 - se selecciona como imagen final, si la resolución es suficientemente alta y el ruido suficientemente bajo; o

- vuelve a introducirse en dicho bucle hasta que tenga una resolución y ruido determinados, es decir una resolución alta resolución y un ruido bajo.

Según un ejemplo de realización, el método comprende disponer al objeto más próximo a una fuente de luz con la que se realiza la iluminación del mismo, que a unos medios de registro con los que se realiza el registro del holograma multiespectral.

En función del ejemplo de realización, la tres o más longitudes de onda se encuentran en un espectro visible por el ojo humano (por ejemplo RGB) o, como mínimo una de las mismas se encuentra en un espectro no visible por el ojo humano, tal como el infrarrojo o el ultravioleta.

5 La presente invención extiende la aplicabilidad de la microscopía sin lentes a un mayor rango de objetos ya que es útil no solo para objetos poco difractivos (o esencialmente transparentes y con baja densidad o porcentaje de objetos en la muestra) sino con un mayor porcentaje de bloqueo de la luz (muestras más opacas y con mayor densidad o porcentaje de objetos en la muestra).

10

Un segundo aspecto de la invención concierne a un microscopio holográfico sin lentes en línea basado en múltiples longitudes de onda, que comprende, de manera en sí conocida:

- medios de soporte configurados y dispuestos para soportar un objeto;
- 15 - medios de iluminación divergente configurados y dispuestos, en relación a dicho objeto soportado por dichos medios de soporte, para iluminar, de manera simultánea, dicho objeto con luz que incluye al menos tres longitudes de onda;
- medios de registro configurados y dispuestos, en relación a dicho objeto soportado por los medios de soporte, para registrar información holográfica de dicho
- 20 objeto iluminado que incluye patrones de difracción generados por dicho objeto para dichas longitudes de onda, que son al menos tres; y
- medios de procesamiento, en conexión con dichos medios de registro para recibir de los mismos al menos dicha información holográfica registrada, y configurados para obtener, por reconstrucción digital, una imagen holográfica compuesta a partir de
- 25 dicha información holográfica registrada.

A diferencia de los microscopios holográficos sin lentes en línea basados en múltiples longitudes de onda conocidos, en el propuesto por el segundo aspecto de la invención, de manera característica:

- dichos medios de registro están configurados y dispuestos para el registro
- 30 simultáneo para todas dichas longitudes de onda, que son al menos tres, de un holograma múltiple policromático de dicho objeto iluminado;
- y porque dichos medios de procesamiento están configurados para obtener, por reconstrucción digital, dicha imagen holográfica compuesta a partir de la información multispectral incluida en dicho holograma múltiple
- 35 policromático.

Según un ejemplo de realización del microscopio del segundo aspecto de la invención, los medios de registro comprenden un único sensor digital con sensibilidad a las tres o más longitudes de onda y unos medios de control que controlan al sensor para realizar dicho registro de manera simultánea para todas las longitudes de onda, en un solo disparo de iluminación.

Según un ejemplo de realización preferido, los medios de registro comprenden un sensor digital con una máscara o filtro o mosaico de celdillas con transmitancia espectral adaptada a las longitudes de onda empleadas en la fuente de iluminación, tal como:

- 10 - una máscara de tipo Bayer sensible a las longitudes de onda rojo (R), verde (G), y azul (B) (mosaico 2x2 de celdillas con 2 filtros G, uno R y uno B, o cualquier otra combinación de filtros RGB); o
- una máscara de tipo RGBE con sensibilidad espectral a las longitudes de onda RGBE, siendo E el denominado color esmeralda (mosaico 2x2 de celdillas con 15 filtro G, uno R, uno B y uno E); o
- una máscara de tipo CYM con sensibilidad espectral a las longitudes de onda cian (C), amarillo (Y) y magenta (M) (mosaico 2x2 de celdillas con 1 filtro C, dos Y, y uno M, o cualquier otra combinación de filtros CYM); o
- una máscara de tipo CYGM con sensibilidad espectral a las longitudes de onda 20 cian (C), amarillo (Y), verde (G) y magenta (M) (mosaico 2x2 de celdillas con 1 filtro C, uno Y, uno G y uno M); o
- una máscara de tipo RGBW con sensibilidad espectral a las longitudes de onda (R), verde (G), azul (B) y blanco (W) (mosaico 2x2 de celdillas con 1 filtro R, uno G, uno B y uno W); o
- 25 - en general, una máscara que combine un mosaico compuesto por celdillas con transmitancia diferente para cada longitud de onda empleada en la fuente de iluminación (mosaico 2x2 o 3x3 o 4x4); o
- una máscara basada no en el sistema de mosaico de celdillas en paralelo (casos anteriores) sino de filtros apilados verticalmente como en el sistema 30 Foveon X3 de Sigma Corporation.

Según un ejemplo de realización del microscopio propuesto por el segundo aspecto de la invención, tanto la transmitancia espectral como el número de celdillas de la máscara o filtro o mosaico, a colocar sobre los píxeles del sensor digital policromático, están adaptados específicamente al espectro y número de dichas tres o

más longitudes de onda, con el fin de que las celdillas transmitan en máximo el patrón de difracción proporcionado por cada una de las longitudes de onda de la iluminación.

Según otro ejemplo de realización alternativo, la transmitancia espectral de las celdillas de la máscara o filtro o mosaico, a colocar sobre los píxeles del sensor digital policromático, permite el paso de la luz a las tres o más longitudes de onda, pero la máscara o filtro o mosaico carece de celdillas cuyas transmitancias espectrales estén adaptadas para transmitir en máximo el patrón de difracción proporcionado por al menos una de dichas tres o más longitudes de onda.

En general, los medios de iluminación divergentes comprenden una fuente puntual de luz compuesta por las tres o más longitudes de onda.

Según diferentes ejemplos de realización, dichos medios de iluminación divergentes comprenden:

- una fuente de iluminación multiespectral estenopeica (es decir tipo "pinhole"); o
- tres o más fuentes de luz láser o de coherencia parcial, una por longitud de onda, acopladas a la entrada de una guía de fibra óptica con una salida configurada para proporcionar iluminación divergente para todas las longitudes de onda; o
- un sistema de iluminación basado en filtros dicróicos de combinación de tres o más longitudes de onda diferentes junto con sistemas ópticos de focalización de luz, como es el caso del sistema de iluminación de los cabezales de los lectores de discos "blu-ray"; o
- un sistema emisor laser de tres o más longitudes de onda ensamblados en un único soporte físico, como es el caso de algunas iatas de diodo con capacidad de emisión en 405/660/780 nanómetros, y cualquier tipo de elementos (lentes, prismas, espejos...) redireccionadores de la luz para su apropiado manejo.

Para un ejemplo de realización del microscopio propuesto por el segundo aspecto de la invención, los medios de procesamiento implementan el procesado digital del método del primer aspecto.

Para otros ejemplos de realización, los medios de procesamiento del microscopio implementan un procesado digital según métodos alternativos al del primer aspecto.

Un tercer aspecto de la invención concierne a un programa de ordenador que incluye instrucciones de código que cuando se ejecutan en un ordenador implementan el procesado digital del método del primer aspecto.

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

5

la Fig. 1 muestra un esquema básico de sistema holográfico de Gabor;

la Fig. 2 es un esquema general de los principales elementos del microscopio propuesto por el segundo aspecto de la invención, para un ejemplo de realización;

la Fig. 3 muestra esquemáticamente a un sistema experimental operando para la validación del microscopio propuesto por el segundo aspecto de la invención considerando iluminación y detección en RGB;

10

la Fig. 4 muestra en su vista superior a un holograma RGB proporcionado por el sensor en color utilizado en el método y microscopio de la presente invención y, en sus tres vistas inferiores, a las imágenes enfocadas de cada canal RGB por separado;

15

la Fig. 5 es un esquema con las imágenes de los diferentes pasos incluidos en el procesado digital de la primera etapa del método propuesto por el primer aspecto de la invención, e indicados junto a las imágenes ilustradas;

la Fig. 6 muestra dos imágenes que ilustran el resultado final proporcionado por la segunda etapa del procesado digital del método propuesto por el primer aspecto de la invención (derecha) en comparación con la imagen resultante de la primera etapa (izquierda);

20

la Fig. 7 ilustra una comparativa de resultados, en la forma de imágenes holográficas reconstruidas, entre el sistema Kreuzer (fila superior) y el método y microscopio propuestos por la presente invención (fila inferior); y

25

la Fig. 8 ilustra los resultados experimentales (por columnas) obtenidos con el método y microscopio propuestos por la presente invención y para dos zonas diferentes de una muestra biológica (esperma de cerdo) como objeto. La fila superior muestra el holograma RGB, la intermedia el resultado obtenido por el método Kreuzer aplicado al canal azul y sin producir la imagen de contraste (ecuación 3), y la inferior el resultado proporcionado por la presente invención.

30

Descripción detallada de unos ejemplos de realización

En la Figura 2 se presenta un esquema de la invención propuesta. Esencialmente, una fuente puntual P_i que emite en múltiples (al menos 3) longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$) ilumina un objeto O situado a una distancia Z de la fuente puntual de iluminación P_i y soportado por unos medios de soporte (no ilustrados). Así iluminado,

35

el objeto O generará múltiples (al menos tres) patrones de difracción correspondientes con cada una de las longitudes de onda utilizadas. Cada uno de dichos patrones de difracción llegará al plano de registro (situado a una distancia L de la fuente puntual de iluminación P_i) donde un sensor digital Rc con sensibilidad espectral a las múltiples (al menos 3) longitudes de onda registrará múltiples (al menos 3) hologramas en línea. La manera de conseguir que el sensor digital Rc sea sensible a las múltiples (al menos 3) longitudes de onda es interponiendo una máscara o filtro o mosaico de celdillas con diferente transmitancia espectral sobre cada uno de los píxeles que integran el sensor digital (típicamente un CCD o un sensor CMOS). A modo de ejemplo, la Figura 2 incluye dos tipos máscaras (mosaicos de tramas de cuadrados con niveles de gris a la derecha del sensor digital Rc) con celdillas de tipo 3x3 y 2x2 píxeles para el caso de 9 y 4 longitudes de onda de iluminación diferentes, respectivamente. De este modo, todos los píxeles con el mismo filtro de transmitancia definirán un canal del sensor digital con sensibilidad a una determinada longitud de onda de iluminación. En el mejor de los casos, cada una de las múltiples longitudes de onda excita única y exclusivamente uno de los canales del sensor digital policromático Rc de manera que extrayendo los píxeles relativos a cada canal se obtiene información por separado del holograma proporcionada por cada longitud de onda de iluminación. Cada uno de estos hologramas en línea sería equivalente al holograma proporcionado por el sistema Kreuzer aunque con diferente longitud de onda. En un caso más desfavorable, diferentes longitudes de onda excitan a la vez diferentes canales del sensor policromático Rc y sería necesaria una etapa adicional de calibración para poder separar independientemente los canales del sensor policromático Rc.

El sensor Rc está asociado o incluye unos medios de control que lo controlan para realizar el registro de los múltiples hologramas en línea de manera simultánea para todas las longitudes de onda, en un solo disparo de iluminación.

Para un ejemplo de realización, el sensor policromático Rc está constituido por una cámara o sensor CCD en color (sensibilidad RGB), el cual se trata de un sensor digital en el que se antepone píxel a píxel una máscara Bayer (celdilla de tipo 2x2 con 1 filtro R, dos filtros G y un filtro B) que filtra la información de color del patrón de difracción incidente sobre el CCD. De este modo, seleccionando las 3 longitudes de onda de la iluminación para que coincidan con los mínimos de transmisión espectral de cada canal complementario, es posible registrar en una única captura de iluminación los tres patrones de difracción proporcionados por el objeto O sin interferencia cruzada del resto de longitudes de onda.

No obstante, para otros ejemplos de realización:

- Ni las longitudes de onda tienen que ser específicamente en RGB.
- Ni tienen que ser tres longitudes de onda: se pueden utilizar 4 o más.
- Ni el CCD tiene que ser con máscara Bayer en RGB: se puede pensar en un filtro específico con sensibilidad en diferentes bandas espectrales).

5 • Ni es necesario sintonizar las longitudes de onda de iluminación con la sensibilidad espectral de los filtros de la máscara Bayer (pueden existir términos cruzados que se pueden eliminar mediante calibración previa).

 • Ni la fuente de iluminación tiene que ser necesariamente un “pinhole” de iluminación: se pueden utilizar alternativamente láseres acoplados con fibra óptica y que sea el propio terminal de la fibra quien proporcione la iluminación divergente, o en sistemas basados en filtros dicróicos de combinación de diferentes longitudes de onda junto con sistemas ópticos (lentes, placas zonales, etc.) de focalización de luz.

Es decir, se trata de un sistema bastante flexible en su definición de hardware que no supone una única implementación experimental.

15 En cualquier caso, al final lo que se obtiene son múltiples (al menos 3) hologramas digitales correspondientes con las múltiples (al menos 3) longitudes de onda empleadas, donde cada uno de dichos hologramas por separado equivale completamente a un sistema Kreuzer. Sin embargo, el método y microscopio propuestos por la presente invención proporciona 3 sistemas Kreuzer simultáneamente, reunidos en un sistema completamente diferente a nivel hardware (emisión y detección policromática adaptada) y software (procesado diferente mediante mezcla ponderada de espectros y algoritmo de iteración de fase) del de Kreuzer, y que además soluciona el problema de las imágenes virtuales en holografía, ya que gracias al procesado digital empleado se elimina casi completamente la contribución de la imagen virtual.

25 A continuación, con referencia a la Fig. 3, se incluye la caracterización experimental del microscopio propuesto por el segundo aspecto de la invención, realizada en laboratorio por los presentes inventores, suponiendo una cámara CCD en RGB (indicada como R_c), en comunicación con un sistema de procesamiento PC para el procesado de los datos proporcionados por la cámara (implementado en el programa Matlab de The MathWorks Inc.), y tres longitudes de onda de iluminación: $\lambda_R = 633$ nm, $\lambda_G = 532$ nm, y $\lambda_B = 405$ nm, a una distancia L de la cámara CCD, iluminando un objeto O dispuesto a una distancia Z de la fuente de iluminación R_i. El esquema del sistema experimental así como algunos datos geométricos y características del sistema se incluyen en la Fig. 3 o bien se indican a continuación:

35 • Diámetro de “pinhole”: 1 μ m

- CCD: AVT 1394 Stingray F-145C, 1038 x 1038 píxeles, 6,45 x 6,45 μm separación entre píxeles
 - NA_{best} (mejor apertura numérica) $\cong 0,16 \rightarrow \text{Res} \cong 2,5 \mu\text{m}$
 - Distancias aproximadas: $L \cong 21 \text{ mm}$, $Z \cong 1 \text{ mm}$
- 5
- Magnificación: $M = L/Z \cong 20$
 - FOV (campo de visión) $\cong 350 \times 350 \mu\text{m}^2$

El objeto O empleado en esta validación experimental ha sido un test de resolución ("USAF positive high-resolution test target") que proporciona detalles de objetos variables en tamaño para testear la resolución del sistema experimental. El holograma RGB proporcionado por el CCD en color así como la imagen proporcionada por cada uno de los tres canales se muestra en la Figura 4. Se puede ver que el holograma RGB proporcionado por el CCD en color (indicado en la Figura como "RGB HOLOGRAM") no proporciona una imagen enfocada del objeto y que extrayendo los píxeles rojos, verdes y azules por separado se pueden reconstruir tres imágenes diferentes monocromas (con diferente resolución) del objeto O (indicadas en la Figura respectivamente como R, G y B) tras aplicar el algoritmo de enfoque digital. En la obtención de las imágenes RGB ilustradas en la Fig. 4 no se han realizado los pasos correspondientes al procesado de la imagen de contraste ni a la corrección de la intensidad según la iluminación láser que se corresponden con las ecuaciones 3 y 4 del sistema Kreuzer (se ha pasado directamente de la ecuación 1 al objeto enfocado).

10

15

20

Tal y como se ha descrito en un apartado anterior, el procesado digital incluido en el método del primer aspecto de la invención (implementados por el microscopio y el programa de ordenador de, respectivamente, el segundo y el tercer aspectos) comprende, para un ejemplo de realización preferido, la realización de dos etapas que incluyen los siguientes pasos:

25

Primera etapa:

- En la primera etapa, se separan los tres canales correspondientes con las tres iluminaciones empleadas. En el caso descrito en el presente apartado, el holograma RGB se separa en las tres componentes RGB originando tres imágenes (hologramas) por separado.
 - Se realiza un procesado digital que conlleva los siguientes pasos:
- 30

- o ecualización inicial de los tres hologramas según la forma de la iluminación empleada para cada canal (corrección de la intensidad según Kreuzer).
- 5 o eliminación de contribuciones cruzadas no deseadas entre canales. Este paso es debido a que, en mayor o menor grado, todas las longitudes de onda contribuyen a todos los hologramas generados. Es decir, la longitud de onda verde contribuye a los canales azul y rojo, la azul a los canales rojo y verde, y la roja a los canales azul y verde. Por tanto, bien con las características teóricas del CCD en color o bien mediante calibración
- 10 o propagación digital y enfoque de cada canal por separado hasta el plano del objeto (cada holograma necesita una distancia de propagación diferente para realizar su enfoque)
- 15 o y mezcla ponderada de los espectros de los tres hologramas enfocados en el dominio de Fourier para la generación de una imagen única a partir de los tres canales.

Hasta aquí la primera etapa.

20 Segunda etapa:

En la segunda etapa se realiza un procesado en bucle de repetición tantas veces como sea necesario hasta que la imagen final posea una alta resolución y bajo ruido. La segunda etapa (algoritmo de iteración de fase) incluye los siguientes

25 pasos:

- o propagación de la imagen única generada en la primera etapa al plano del sensor digital con las distancias de propagación previamente calculadas para cada canal.
- o de este modo, se generan tres nuevos hologramas del objeto desenfocado donde se acumula la fase originada en cada holograma debida a la propagación digital y se sustituye la amplitud por la raíz cuadrada de la intensidad del holograma correspondiente a dicho canal.
- 30 o estos tres nuevos hologramas se vuelven a propagar digitalmente de nuevo hasta el plano del objeto (cada uno con su correspondiente
- 35 distancia de propagación).

- o y se realiza de nuevo la mezcla ponderada de los espectros en dominio de Fourier para acabar generando una nueva/diferente imagen única que vuelve a ser la entrada de una nueva iteración del bucle.

5 Los diferentes pasos del procesado digital propuesto pueden seguirse a través de las Figuras 5 y 6.

La Figura 5 muestra las imágenes intermedias correspondientes a la primera etapa del procesado, donde se han indicado con las referencias A1-A6 las siguientes acciones:

10 A1: Obtención de las tres imágenes enfocadas correspondientes a los tres canales por separado.

A2: Corrección de la intensidad según la iluminación de cada canal.

A3: Eliminación de los términos cruzados entre canales.

A4: Transformada de Fourier digital de cada canal.

15 A5: Mezcla ponderada de espectros en plano de Fourier, asignando valores de ponderación de 0, 0,33, 0,5 y 1 a diferentes zonas de gris de la máscara indicada como M_p , para la obtención del espectro único E_u fruto de la combinación ponderada de los espectros de los tres canales.

A6: Generación de la imagen única entrada de la segunda etapa.

20

La Figura 6 muestra, en su vista derecha, la imagen final proporcionada por la segunda etapa en comparación con la imagen resultante de la primera etapa (vista izquierda).

Finalmente, y única y exclusivamente a modo comparativo, la Figura 7 muestra 25 las imágenes obtenidas con el sistema Kreuzer (imágenes obtenidas de la publicación "J. Garcia-Sucerquia, W. Xu, S. K. Jericho, P. Klages, M. H. Jericho, and H. J. Kreuzer, "Digital in-line holographic microscopy," Appl. Opt. 45, 836-850, 2006") cuando el objeto utilizado es un test de resolución análogo al empleado en la validación experimental de la presente invención utilizada en el presente apartado, y con una configuración 30 experimental también muy parecida (diámetro del "pinhole" de iluminación: 0,5 μm , longitud de onda: 408 nm, apertura numérica: 0,208).

Las imágenes A y D de la Figura 7 muestran los hologramas del test de resolución tanto para el sistema Kreuzer como para el de la presente invención, respectivamente. Puede observarse cómo el método y microscopio propuestos por la 35 presente invención proporcionan un holograma RGB consecuencia de las tres longitudes de onda empleadas en la iluminación mientras que el sistema Kreuzer

proporciona un holograma monocromo. La imagen A de la Figura 7 muestra el holograma de contraste (ecuación 3) del test de resolución para el sistema Kreuzer. Las imágenes B y C muestran los resultados obtenidos con el método Kreuzer siendo la imagen C una ampliación de la parte central de la imagen B. La imagen D de la Figura 7 muestra el holograma en color proporcionado por la presente invención y compuesto no por una única longitud de onda (como sería el caso del sistema Kreuzer y la imagen A) sino por suma de tres. La imagen E de la Figura 7 muestra el resultado proporcionado por el canal azul según la presente invención (diámetro del "pinhole" de iluminación: 1 μm , longitud de onda: 405 nm, apertura numérica: 0,16) donde se observa cómo, salvo por no haber aplicado la ecuación 3, se obtiene una imagen muy similar a la proporcionada por el sistema Kreuzer. Y finalmente, la imagen F presenta de nuevo el resultado obtenido mediante la presente invención tras haber aplicado la segunda etapa. Puede observarse como, globalmente y por comparación con las imágenes C y E representativas del método Kreuzer, se ha reducido el ruido (menor variación del fondo de iluminación) y se ha mejorado el contraste (diferencia en nivel de gris entre el fondo y las barras horizontales y verticales del test de resolución) de la imagen resultante como consecuencia de la eliminación de la imagen virtual tras la aplicación del método propuesto.

Adicionalmente, la invención propuesta se ha validado experimentalmente para una muestra biológica compuesta por espermatozoides de cerdo. La figura 8 presenta algunas de las imágenes obtenidas con el sistema experimental propuesto, es decir con el microscopio de la presente invención, para dos zonas diferentes de la muestra biológica. La fila superior muestra el holograma RGB, la intermedia el resultado obtenido por el método Kreuzer aplicado al canal azul y sin producir la imagen de contraste (ecuación 3), y la inferior el resultado proporcionado por la presente invención. Nuevamente, podemos observar la mejora global en la calidad de la imagen finalmente obtenida en cuanto a ruido, contraste y homogeneidad en todo el campo objeto proporcionada por el método y sistema propuesto en comparación con el método y sistema Kreuzer.

Un experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realización descritos sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1.- Método de reconstrucción holográfico basado en microscopía sin lentes en línea con múltiples longitudes de onda, que comprende:

- 5 - iluminar, de manera simultánea, un objeto (O) con luz divergente que incluye al menos tres longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$);
- registrar información holográfica de dicho objeto iluminado (O) que incluye patrones de difracción generados por dicho objeto (O) para dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres; y
- 10 - obtener, por reconstrucción digital, una imagen holográfica compuesta a partir de al menos dicha información holográfica registrada;
- estando el método **caracterizado** porque comprende llevar a cabo dicha etapa de registro de información holográfica mediante el registro simultáneo para todas dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, de un holograma múltiple policromático, y obtener dicha imagen holográfica compuesta a partir de la información
- 15 multiespectral incluida en dicho holograma múltiple policromático.

2.- Método según la reivindicación 1 caracterizado porque comprende realizar dicha etapa de registro simultáneo en un solo disparo de la iluminación y con un único sensor digital (Rc) con sensibilidad a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que

20 son al menos tres.

3.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho sensor digital (Rc) tiene sensibilidad a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, porque comprende una máscara o filtro o mosaico de celdillas con transmitancia espectral adaptada, comprendiendo el método la adaptación específica tanto de la

25 transmitancia espectral como del número de celdillas de la máscara o filtro o mosaico a colocar sobre los píxeles del sensor digital al espectro y número de longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$) elegidas para dicha etapa de iluminación simultánea, con el fin de que las celdillas transmitan en máximo el patrón de difracción proporcionado por cada una de las longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$) de la iluminación.

4.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho sensor digital (Rc) tiene sensibilidad a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, porque comprende una máscara o filtro o mosaico de celdillas con transmitancia espectral que permite el paso de la luz a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), pero que carece de celdillas cuyas transmitancias espectrales estén adaptadas para

35 transmitir en máximo el patrón de difracción proporcionado por al menos una de las longitudes de onda de la iluminación ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres.

5.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende realizar únicamente dicha iluminación simultánea con dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, sin requerir de iluminaciones adicionales del objeto (O).

5 6.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende, para obtener dicha imagen holográfica compuesta, realizar un procesado digital de dicha información multispectral relativa a al menos dichas tres longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), e incluida en unos respectivos canales, que incluye realizar al menos una mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los
10 espectros correspondientes a cada longitud de onda.

7.- Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho procesado digital comprende utilizar dicha información multispectral para eliminar la contribución de la imagen virtual en dicha imagen holográfica compuesta.

8.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado
15 porque dicho holograma registrado es un único holograma multicromático o multispectral, y porque dicho procesado digital incluye una primera etapa que comprende realizar de manera secuencial:

- una separación de la información correspondiente a cada longitud de onda incluida en dicho holograma multicromático o multispectral, obteniendo al menos tres
20 correspondientes hologramas monocromáticos, uno por longitud de onda o canal;

- una ecualización inicial o corrección de intensidad de los tres hologramas monocromáticos según la iluminación empleada para cada canal;

- una eliminación de contribuciones cruzadas no deseadas entre canales;
- una propagación digital y enfoque de cada canal por separado hasta el plano
25 del objeto; y

- dicha mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros de al menos tres hologramas monocromáticos, una vez enfocados, para la generación de dicha imagen holográfica compuesta a partir de al menos tres canales.

9.- Método según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho procesado digital incluye una segunda etapa que comprende realizar de manera secuencial y en bucle un algoritmo de iteración de fase:

- una propagación digital de dicha imagen holográfica compuesta al plano de registro con las distancias de propagación previamente calculadas para cada canal, generando así al menos tres nuevos hologramas del objeto desenfocado;

35 - un almacenamiento, en estos al menos tres nuevos hologramas generados, de la fase generada en la propagación digital para cada uno de los al menos tres canales,

y una sustitución de la amplitud obtenida en la propagación digital para los al menos tres canales por la registrada inicialmente para cada uno de los al menos tres canales;

- una propagación digital de al menos dichos tres nuevos hologramas hasta el plano del objeto, cada uno con su correspondiente distancia de propagación; y

5 - una mezcla ponderada en el dominio de Fourier de los espectros de los tres nuevos hologramas para generar una nueva imagen holográfica compuesta que, en función de su resolución y ruido:

- se selecciona como imagen final; o

10 - vuelve a introducirse en dicho bucle hasta que tenga una resolución y ruido determinados.

10.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende disponer a dicho objeto (O) más próximo a una fuente de luz (Pi) con la que se realiza dicha iluminación del mismo, que a unos medios de registro (Rc) con los que se realiza dicho registro del holograma multispectral.

15 11.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, se encuentran en un espectro visible por el ojo humano.

20 12.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque al menos una de dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, se encuentra en un espectro no visible por el ojo humano.

13.- Microscopio holográfico sin lentes en línea basado en múltiples longitudes de onda, que comprende:

- medios de soporte configurados y dispuestos para soportar un objeto (O);

25 - medios de iluminación divergente (Pi) configurados y dispuestos, en relación a dicho objeto (O) soportado por dichos medios de soporte, para iluminar, de manera simultánea, dicho objeto (O) con luz que incluye al menos tres longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$);

30 - medios de registro (Rc) configurados y dispuestos, en relación a dicho objeto (O) soportado por los medios de soporte, para registrar información holográfica de dicho objeto iluminado (O) que incluye patrones de difracción generados por dicho objeto (O) para dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres; y

35 - medios de procesamiento (PC), en conexión con dichos medios de registro (Rc) para recibir de los mismos al menos dicha información holográfica registrada, y configurados para obtener, por reconstrucción digital, una imagen holográfica compuesta a partir de dicha información holográfica registrada;

estando el microscopio **caracterizado** porque:

- dichos medios de registro (Rc) están configurados y dispuestos para el registro simultáneo para todas dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, de un holograma múltiple policromático de dicho objeto iluminado (O);

5 - y porque dichos medios de procesamiento (PC) están configurados para obtener, por reconstrucción digital, dicha imagen holográfica compuesta a partir de la información multiespectral incluida en dicho holograma múltiple policromático.

10 14.- Microscopio según la reivindicación 13, caracterizado porque dichos medios de registro (Rc) comprenden un único sensor digital policromático con sensibilidad a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, y unos medios de control que controlan al sensor digital policromático para realizar dicho registro simultáneo para todas las longitudes de onda, en un solo disparo de iluminación.

15 15.- Microscopio según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque dichos medios de procesamiento (PC) implementan el procesado digital del método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

20 16.- Microscopio según la reivindicación 14, caracterizado porque dichos medios de registro (Rc) comprenden una máscara o filtro o mosaico de celdillas con transmitancia espectral adaptada a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, dispuesta o dispuesto frente a dicho sensor digital policromático.

25 17.- Microscopio según la reivindicación 16, caracterizado porque tanto la transmitancia espectral como el número de celdillas de dicha máscara o filtro o mosaico, a colocar sobre los píxeles del sensor digital policromático, están adaptados específicamente al espectro y número de dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, con el fin de que las celdillas transmitan en máximo el patrón de difracción proporcionado por cada una de las longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$) de la iluminación.

30 18.- Microscopio según la reivindicación 16, caracterizado porque la transmitancia espectral de las celdillas de dicha máscara o filtro o mosaico, a colocar sobre los píxeles del sensor digital policromático, permite el paso de la luz a dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres, pero la máscara o filtro o mosaico carece de celdillas cuyas transmitancias espectrales estén adaptadas para transmitir en máximo el patrón de difracción proporcionado por al menos una de dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres.

35 19.- Microscopio según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizado porque dichos medios de iluminación divergente (Pi) comprenden una

fuelle puntual de luz compuesta por dichas longitudes de onda ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots$), que son al menos tres.

20.- Microscopio segun la reivindicacion 19, caracterizado porque dichos medios de iluminacion divergente (Pi) comprenden:

- 5
- una fuente de iluminacion multiespectral estenopeica; o
 - al menos tres fuentes de luz laser, una por longitud de onda, acopladas a la entrada de una guia de fibra optica con una salida configurada para proporcionar iluminacion divergente para todas las longitudes de onda, que son al menos tres; o
 - un sistema de iluminacion basado en filtros dicroicos de combinacion de al
- 10 menos tres diferentes longitudes de onda junto con sistemas opticos de focalizacion de luz; o
- un sistema emisor laser de tres o mas longitudes de onda ensamblados en un unico soporte fisico, como es el caso de algunas latas de diodo con capacidad de emision en 405/660/780 nanometros, y cualquier tipo de elementos redireccionadores
- 15 de la luz para su apropiado manejo.

21.- Programa de ordenador que incluye instrucciones de codigo que cuando se ejecutan en un ordenador implementan el procesado digital del metodo segun una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

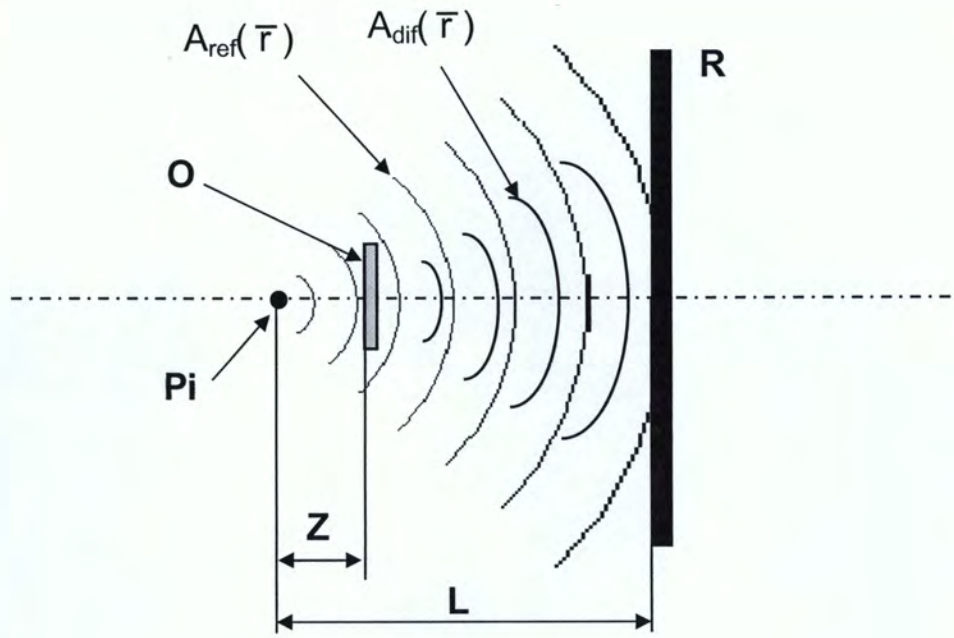


Fig. 1

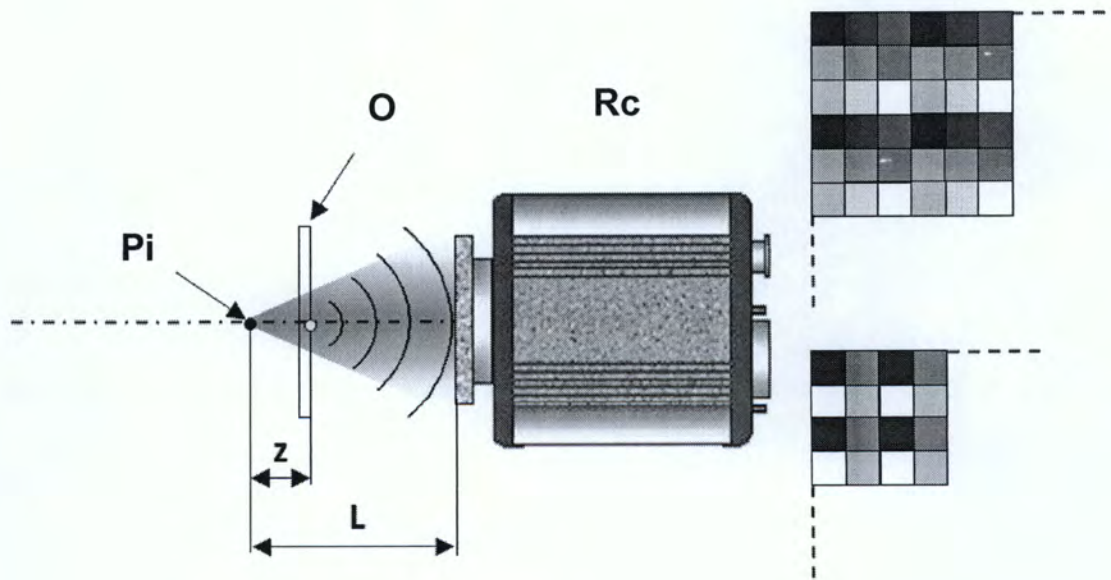


Fig. 2

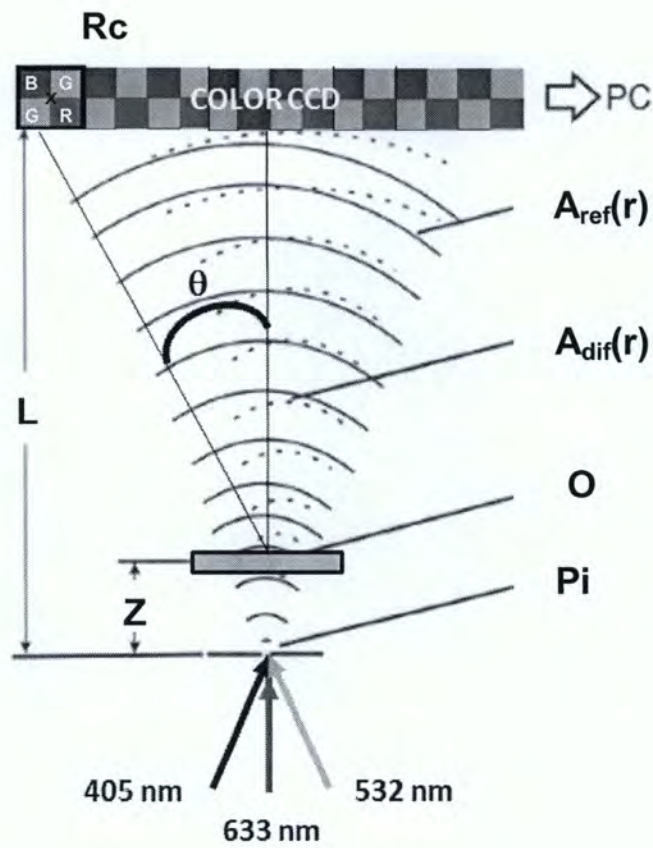


Fig. 3

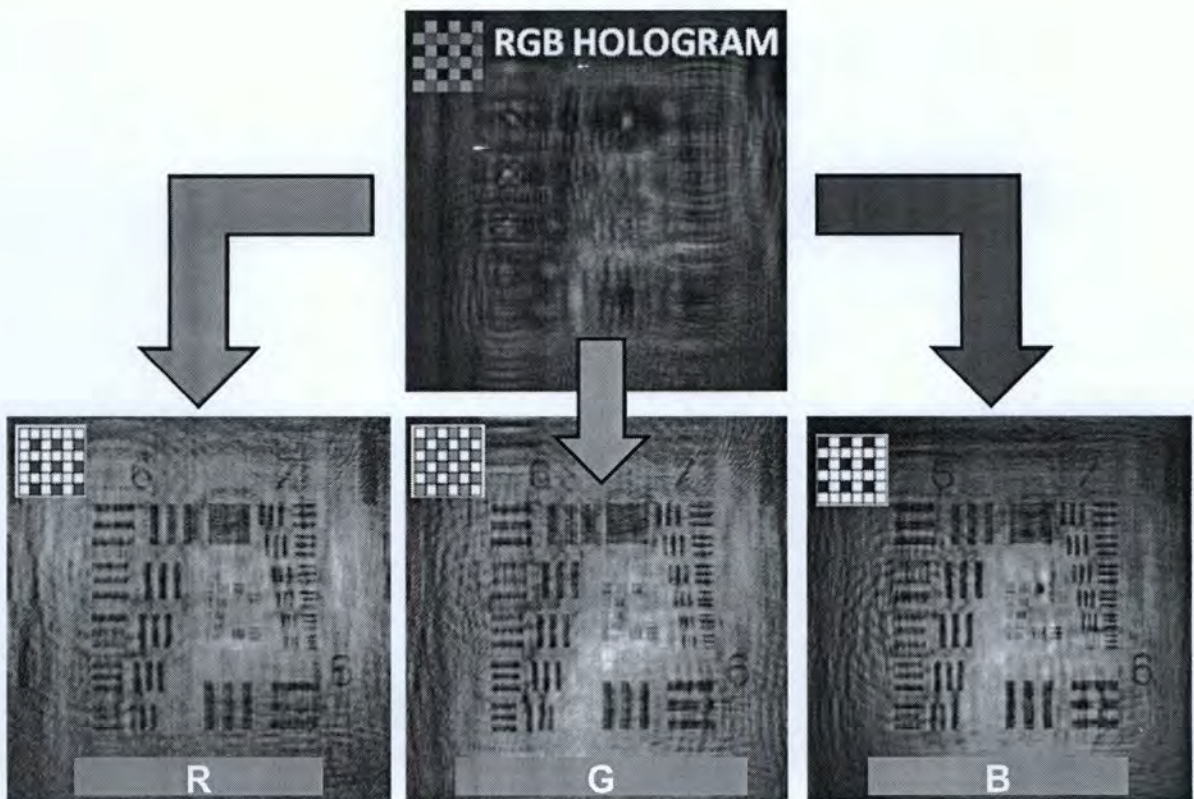


Fig. 4

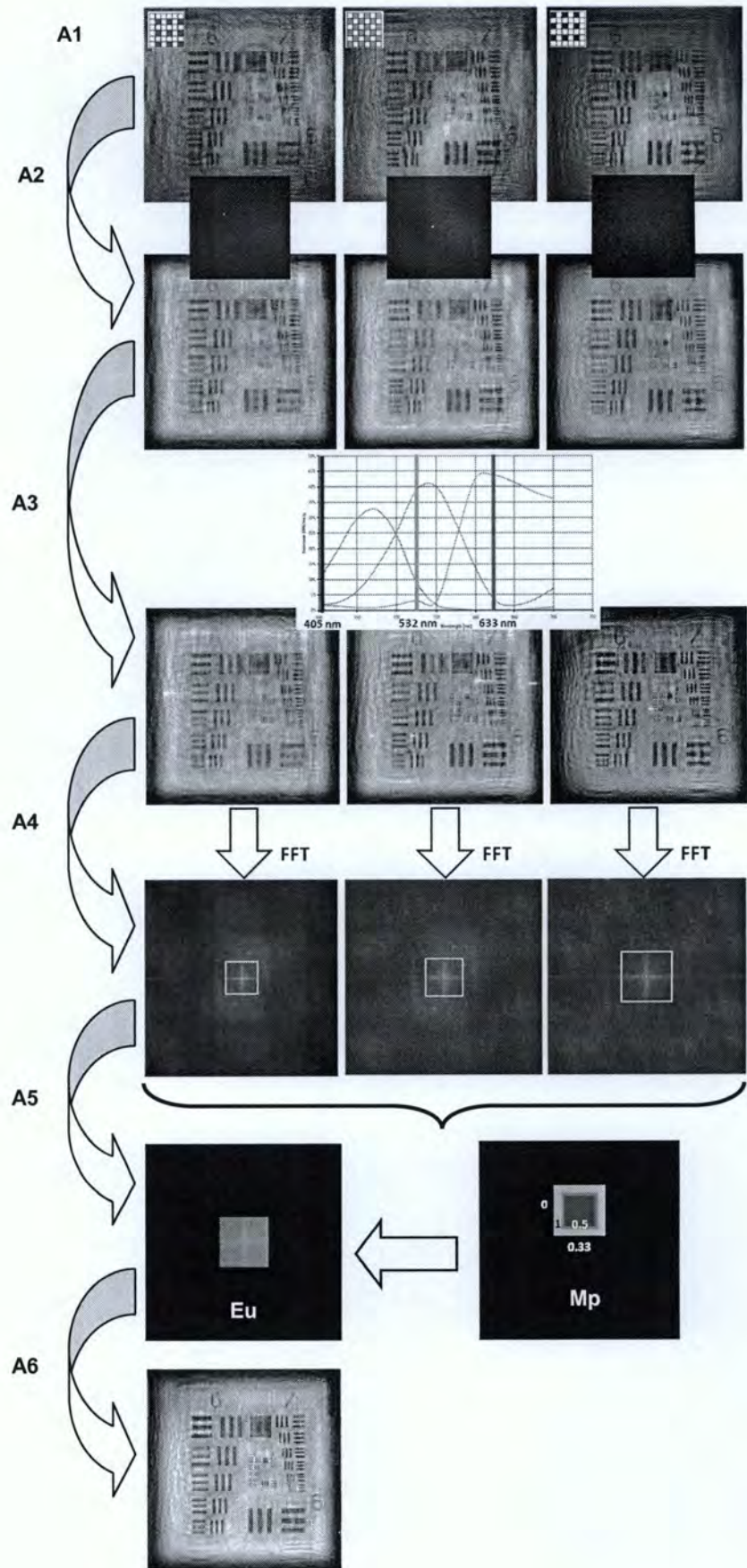


Fig. 5

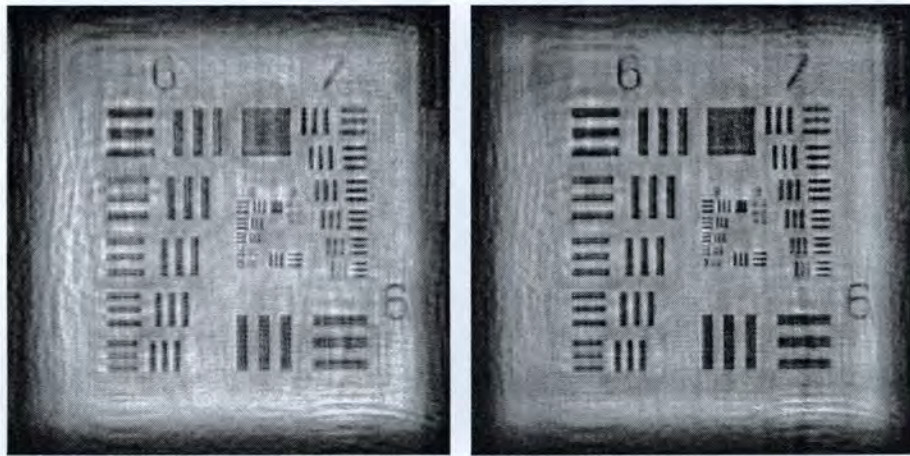


Fig. 6

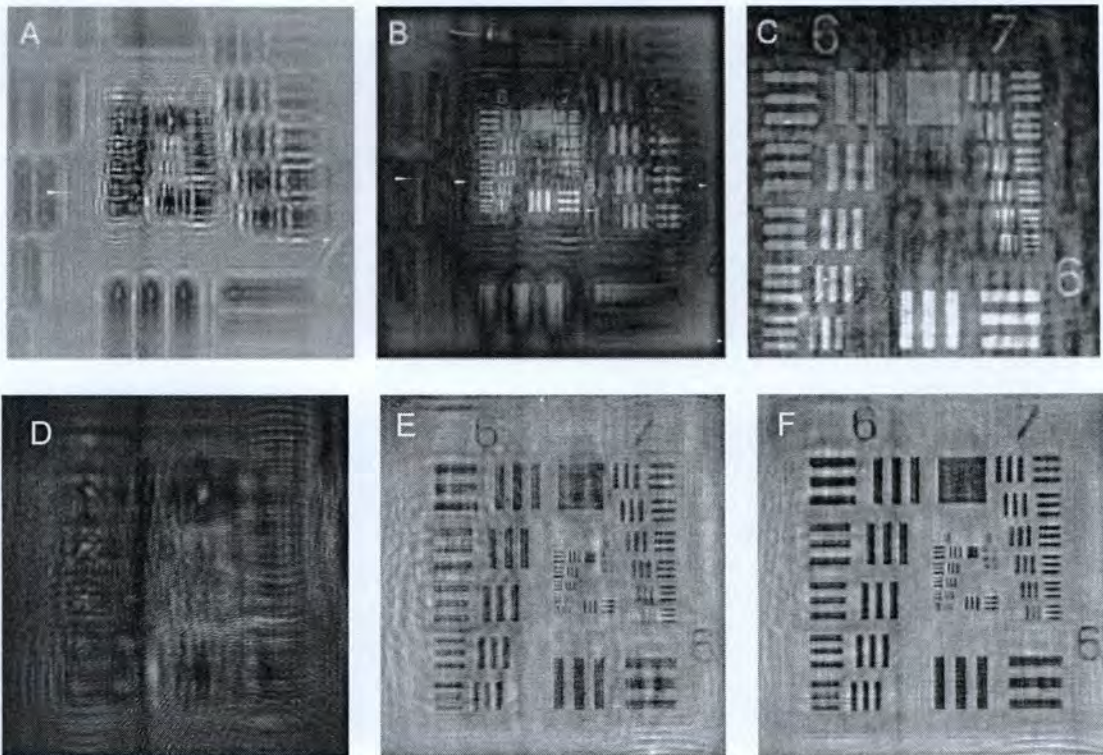


Fig. 7

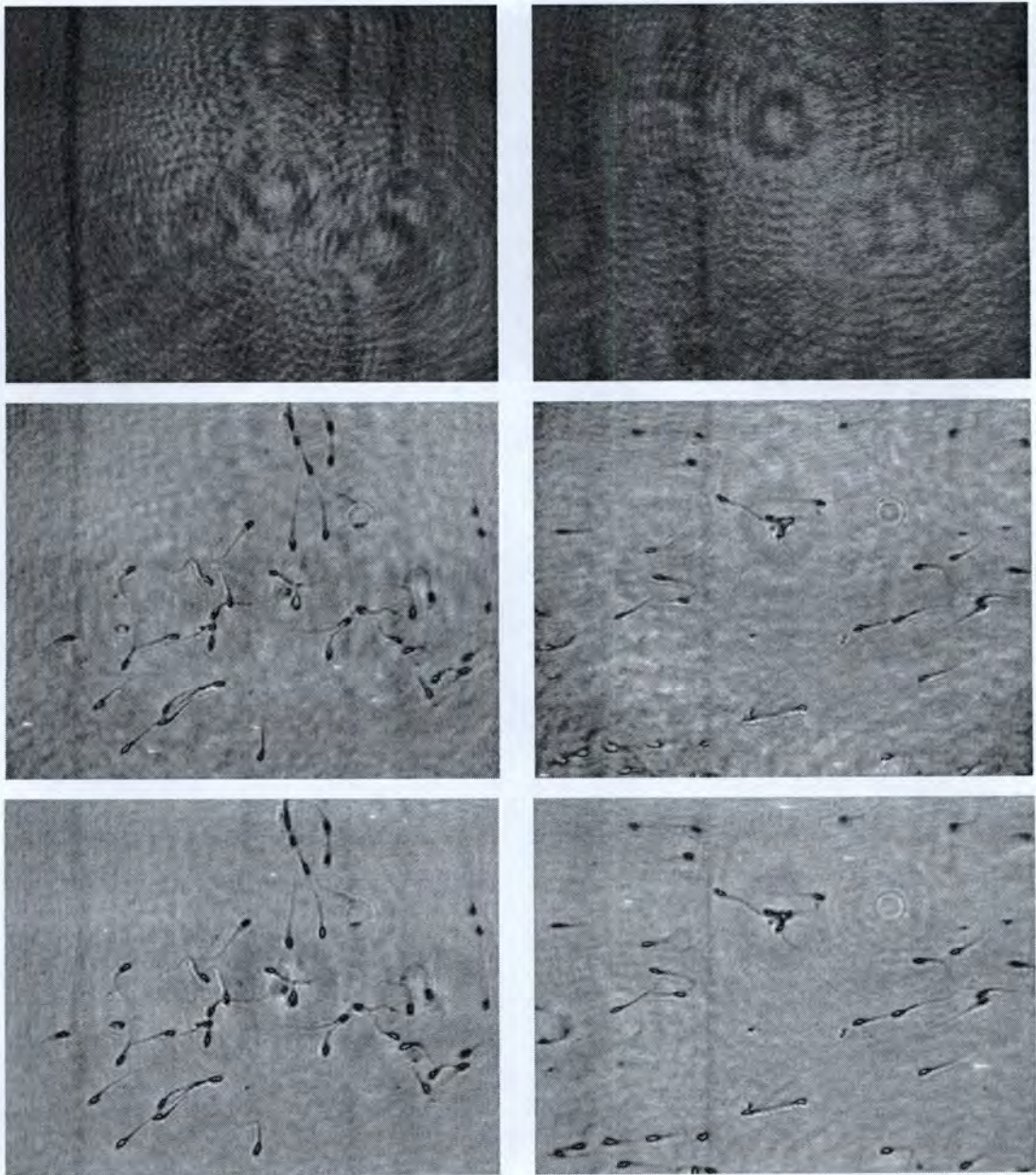


Fig. 8



- ②① N.º solicitud: 201300750
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.08.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G03H1/26** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RYLE, J., McDONNELL, S. & SHERIDAN, J.: "Lensless multispectral digital in-line holographic microscope", J. Biomed. Opt., Vol. 16(12), 126004, diciembre de 2011, páginas 1-17.	1,2,4-7,10-15, 19-21
A	RYLE, J. et al.: "Multispectral lensless digital holographic microscope: imaging MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell cultures", Proc. of SPIE, Vol. 7442, 744206, 2009, páginas 1-11.	1,2,4-7,10-15, 19-21
A	US 2012/0148141 A1 (OZCAN, A. et al.) 14.06.2012, resumen; párrafos [0006]-[0012],[0034],[0038]-[0041],[0044]-[0071]; figuras 1,3.	1,2,4-7,10-15, 19-21
A	US 3695744 A (CLAY, B.) 03.10.1972, todo el documento.	1-21
A	GARCÍA-SUCERQUIA, J. et al.: "Microscopia holográfica digital sin lentes: una herramienta para estudiar el micromundo en cuatro dimensiones", DYNA, Vol. 79, N° 175, octubre de 2012, ISSN: 0012-7353, páginas 29-37.	

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.09.2014

Examinador
Ó. González Peñalba

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G03H, G02B, G06T

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.09.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RYLE, J., McDONNELL, S. & SHERIDAN, J.: "Lensless multispectral digital in-line holographic microscope", J. Biomed. Opt., Vol. 16(12), 126004, diciembre de 2011, páginas 1-17.	diciembre 2011
D02	RYLE, J. et al.: "Multispectral lensless digital holographic microscope: imaging MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell cultures", Proc. of SPIE, Vol. 7442, 744206, 2009, páginas 1-11.	2009
D03	US 3695744 A (CLAY, B.)	03.10.1972

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Se ha considerado, dentro del plazo de tiempo establecido al efecto, que la invención definida en las reivindicaciones 1-21 de la presente Solicitud tiene novedad y actividad inventiva por no estar comprendida en el estado de la técnica ni poder deducirse de este de un modo evidente por un experto en la materia.

Se han encontrado en el estado de la técnica numerosos documentos referidos, como la invención, a la microscopia holográfica digital multiespectral en línea sin lentes, pero ninguno de ellos con todas las características esenciales constitutivas de esta. Así, por ejemplo, el documento D01, citado en el Informe sobre el Estado de la Técnica (IET) con la categoría A y considerado el antecedente tecnológico más próximo al objeto definido en la primera reivindicación, describe un microscopio holográfico digital en línea basado en los mismos principios de funcionamiento que la invención y en el que se usa como fuente de iluminación, en una variante de realización, un LED policromático que emite en tres longitudes de onda simultáneamente. No se recoge, sin embargo, la característica esencial de formación de un holograma múltiple policromático en una captación simultánea para un tratamiento conjunto, sino más bien la recogida secuencial de información independiente para las diversas longitudes de onda, de las que únicamente se obtienen hologramas parciales. Asimismo, el documento D02, también citado en el IET con la categoría A, habla vagamente del uso, en un microscopio holográfico multiespectral, de dos longitudes de onda diferentes, pero tampoco lo concreta en la generación de un holograma múltiple policromático ni aporta, por lo tanto, ningún tratamiento de reconstrucción específico de una imagen holográfica compuesta.

Esta característica es, por tanto, diferenciadora de la invención respecto a D01 y D02, como lo es también respecto al documento D03, también citado en el IET y en el que se registran, en una técnica holográfica multiespectral de aplicación generalista, múltiples hologramas en diferentes longitudes de onda, pero cada uno con un ángulo de iluminación diferente, de modo que, aunque se utiliza un mismo medio de registro, lo que se obtiene en él es una mera acumulación de hologramas monocromáticos no relacionados, en lugar de un holograma múltiple policromático. Tal diferencia constituye, como se aprecia, una solución a aspectos ni siquiera contemplados en dichos documentos y es, por tanto, esencial y distintiva de la invención, confiriéndole con respecto a estos novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la vigente Ley de Patentes.