



(10) **DE 10 2018 114 090 A1** 2019.12.19

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2018 114 090.8**
(22) Anmeldetag: **13.06.2018**
(43) Offenlegungstag: **19.12.2019**

(51) Int Cl.: **G06T 3/40** (2006.01)
G06T 7/45 (2017.01)
G06T 7/66 (2017.01)
G02B 21/00 (2006.01)
G02B 21/16 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(71) Anmelder:
SURFACE CONCEPT GmbH, 55124 Mainz, DE

(74) Vertreter:
**Blumbach Zinngrebe Patentanwälte PartG mbB,
65187 Wiesbaden, DE**

(72) Erfinder:
**Valdaitsev, Dmitry, Dr., 55118 Mainz, DE; Oelsner,
Andreas, Dr., 65203 Wiesbaden, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

HENRIQUES, R. et al: QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. Nature methods, vol.7 no.5, Mai 2010, Seiten 339-340.

Lookup-Tabelle. In: Wikipedia. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Lookup-Tabelle&oldid=176713409>, Stand 20.04.2018 [abgerufen am 04.04.2019].

Naidu, D.K.; Fisher, R.B.: A Comparative Analysis of Algorithms for Determining the Peak Position of a Stripe to Sub-pixel Accuracy. BMVC 1991, Seiten 217-225.

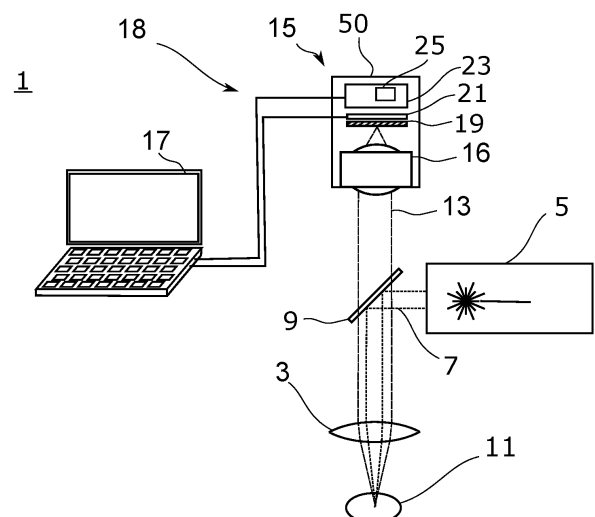
SMALL, A., STAHLHEBER, S.: Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy. Nature methods, vol.11 no.3, März 2014, Seiten 267-279.

BATES, M. et al: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM): A Method for Superresolution Fluorescence Imaging. Cold Spring Harb Protocols, 2013, doi: 10.1101/pdb.top075143, Seiten 498-520.

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Bildverarbeitungsvorrichtung und Verfahren zur Bildverarbeitung, insbesondere für ein suprauflösendes Mikroskop**



(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Bildverarbeitungsvorrichtung und ein mit der Vorrichtung durchführbares Bildverarbeitungsverfahren, um aus Bilddaten Koordinaten von Helligkeitsmaxima zu extrahieren. Die Erfindung ist insbesondere für die Verarbeitung von Bilddaten eines suprauflösenden Lokalisationsmikroskops geeignet.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft allgemein Verfahren und Vorrichtungen zur Bildverarbeitung. Die Erfindung betrifft im Speziellen eine Bildverarbeitungsvorrichtung und ein mit der Vorrichtung durchführbares Bildverarbeitungsverfahren, um aus Bilddaten Koordinaten von Helligkeitsmaxima zu extrahieren. Die Erfindung ist insbesondere für die Verarbeitung von Bilddaten eines superauflösenden Lokalisationsmikroskops geeignet.

[0002] Unter superauflösender Mikroskopie versteht der Fachmann im Allgemeinen lichtmikroskopische Verfahren und Vorrichtungen, welche Bildinformationen mit Auflösungen unterhalb des Abbeschen Beugungslimits liefern. Es sind eine Reihe von verschiedenen Prinzipien für superauflösende Mikroskopie bekannt, die unter anderem darauf basieren, hinreichend räumlich isolierte Lichtemitter zu erfassen, deren Größe deutlich unter dem Beugungslimit des optischen Systems liegt. Auf diese Weise können die Lichtemitter der zu untersuchenden Probe mit einer höheren Genauigkeit lokalisiert werden, als diese das optische System an sich gestattet.

[0003] Verfahren des Prinzips der Lokalisationsmikroskopie werden als STORM, dSTORM, PALM und SPDM (Spektrale Präzisions-Distanz-Mikroskopie) bezeichnet. Bei diesen Verfahren wird die Fluoreszenz selektiv angeregter oder abstrahlender, hinreichend weit entfernter Emitter ausgewertet. Die Emitter lassen sich räumlich genau lokalisieren, da sich das Maximum des durch die Punktspreizfunktion des Mikroskops aufgeweiteten optischen Signals immer noch genau bestimmen lässt.

[0004] Auch wenn die verschiedenen superauflösenden Mikroskopieverfahren mittlerweile sehr hohe Ortsauflösungen erreichen, ist ihr praktischer Nutzen, etwa in der Medizin für histologische Untersuchungen noch sehr begrenzt

Die derzeitige Realisierung der superauflösenden Lokalisationsmikroskopie bringt die Übertragung sehr großer Datenmengen von der Kamera zum Auswerterechner mit sich. Diese betragen bis über 100 Gigabyte für Daten, die zur Rekonstruktion eines einzigen superaufgelösten Bildes benötigt werden. Auch wenn eine Vorverarbeitung der Daten mit der Festlegung von auszuwertenden Bildausschnitten (sogenannte „Regions of Interest“, ROI) erfolgt, ergeben sich noch sehr hohe Datenmengen von mehreren 100 Megabyte pro Bild. Diese Daten müssen sowohl gespeichert als auch prozessiert werden. Häufig kann erst nach Abschluss eines Experimentes entschieden werden, ob dieses Vorgehen erfolgreich war. Bei der Aufnahme der Daten wird jedoch in der Regel aufgrund der lokalisierten Fluoreszenzsignale und der Struktur der Probe nur ein rein stochastisch verteilter Anteil von unter 10% der auf der Kamera vorhandenen Pixel genutzt. Aus diesem Grund ist der überwiegende Teil der übertragenen und gespeicherten Daten ohne Informationsgehalt, führt aber zur Belegung großer Speicherkapazitäten und nimmt einen großen Teil der Rechnerkapazität bei Transfer und Bearbeitung in Anspruch. Hierbei ist nicht nur der Speicherbedarf ein Problem. Vielmehr verhindern die großen Datenmengen eine schnelle Bearbeitung der Daten einschließlich deren Darstellungen. Dies führt dazu, dass bei der superauflösenden Lokalisationsmikroskopie ein Bild der Probe erst nach längerer Zeit zur Verfügung steht.

[0005] Der Erfindung liegt daher allgemein die Aufgabe zugrunde, die Auswertung der Bilddaten zu beschleunigen. Diese Aufgabe wird durch den Gegenstand der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

[0006] Demgemäß sieht die Erfindung eine Bildverarbeitungsvorrichtung insbesondere für die Bilddaten eines superauflösenden Lokalisationsmikroskops vor, welche eine Recheneinrichtung zur Verarbeitung der Bilddaten aufweist, die eingerichtet ist, Koordinaten der Maxima von Helligkeitsverteilungen in den Bilddaten mit einer Genauigkeit zu bestimmen, die höher als der Pixelabstand ist, wobei die Recheneinrichtung eingerichtet ist, in den Bilddaten Helligkeitsmaxima anhand der Überhöhung der Helligkeitswerte von Pixeln relativ zu benachbarten Pixeln zu bestimmen, und wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung weiterhin eingerichtet ist, die Koordinaten eines Helligkeitsmaximas zu bestimmen, indem diese Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel bildet und diese Differenzen in geordneter Reihenfolge entsprechend der räumlichen Abfolge der Pixel zu verkettet, wobei die Recheneinrichtung weiterhin einen Speicher mit einer darin abgelegten Tabelle mit Koordinatenwerten aufweist, wobei die Recheneinrichtung eingerichtet ist, einen Koordinatenwert aus der Tabelle anhand einer durch die verketteten Differenzwerte bestimmten Adresse auszulesen.

[0007] Mit anderen Worten bilden die verketteten oder verknüpften Differenzen eine Adresse, wobei die Tabelle die Adressen bestimmten Koordinaten zuordnet. Diese Zuordnung kann anhand eines geeigneten Modells errechnet werden. So führt beispielsweise eine Gauss-förmige Helligkeitsverteilung in einem Maximum zu einem bestimmten Muster von Differenzen, das anders ist, als etwa bei einer Lorenz-förmigen Verteilung. Die Tabelle kann im Vorhinein berechnet und abgespeichert werden. Damit werden die besonders aufwändigen Berechnungen vor der Messung durchgeführt. Die ansonsten anfallende Bestimmung der Koordinaten

der Helligkeitsmaxima durch Anpassung des jeweiligen Modells der Helligkeitsverteilung wird durch sehr einfache Rechenoperationen, nämlich die Differenzbildung, die Verkettung der Differenzwerte zu Adressen und das Auslesen der Koordinaten an der durch die Adressen bestimmten Position der Tabelle, beziehungsweise der Speicherposition, ersetzt.

[0008] Im Allgemeinen ist es sinnvoll, eine solche Bestimmung für zwei unterschiedliche Raumrichtungen, also etwa x- und y-Richtung durchzuführen. Dementsprechend wird dazu eine zweidimensionale Tabelle gespeichert. In bevorzugter Ausgestaltung der Erfindung enthält der Speicher also eine zweidimensionale Tabelle, wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung dazu eingerichtet ist, Differenzen von Helligkeitswerten entlang zweier unterschiedlicher Richtungen zu bilden, für jede Richtung die Differenzen zu einer Adresse zu verketteten und aus der Tabelle die Koordinaten der Raumrichtungen an der durch die beiden Adressen bestimmten Position auszulesen.

[0009] Die Erfindung eignet sich allgemein dazu, aus Bilddaten, die aufgrund einer Beugungsbegrenzung oder allgemein optischen Abberationen eine Unschärfe aufweisen, die Position punktförmiger Helligkeitsmaxima exakt zu bestimmen. Mit besonderem Vorteil kann dies wie gesagt bei der Verarbeitung von Bilddaten von supraauflösenden Lokalisationsmikroskopen verwendet werden. Gemäß einem Aspekt sieht die Erfindung daher auch ein supraauflösendes Mikroskop vor, welches

- eine Anregungsquelle zur Anregung von Fluoreszenzlicht in einer mit dem Mikroskop zu untersuchenden und vor einem Objektiv des Mikroskops angeordneten Probe,
- eine Kamera mit einem optoelektronischen Sensor zur Aufzeichnung des mikroskopischen Bilds des durch Fluoreszenzanregung von der Probe emittierten Lichts, und eine erfindungsgemäße Bildverarbeitungsvorrichtung umfasst, welche mit dem Sensor verbunden ist, um aus dem Sensor ausgelesene Bilddaten zu verarbeiten und die Koordinaten von Helligkeitsmaxima zu bestimmen.

[0010] Die Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß der Erfindung kann zumindest teilweise in einem Mikrocontroller implementiert sein. Dies ist möglich, da die Erfindung die Bildverarbeitung zur Umrechnung der Bilddaten in Daten, die die Koordinaten von Helligkeitsmaxima in Superauflösung enthalten, mit sehr einfachen Berechnungen durchführt. Demgemäß ist in einer Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung eine Auswerteelektronik mit zumindest einem Mikrocontroller umfasst, welcher eingerichtet ist, zumindest die Berechnung der Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel durchzuführen.

[0011] Um die Menge an zu übertragenden Daten zu reduzieren, ist in besonders bevorzugter Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die Auswerteelektronik in einer Kamera integriert ist. Auf diese Weise kann der Datenstrom von der Kamera zu einem Rechner für die weitere Bearbeitung der Daten erheblich reduziert werden. Gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung ist also vorgesehen, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung neben der Auswerteelektronik einen Rechner umfasst und die Auswerteelektronik in einer Kamera integriert ist, die an den Rechner zur Übertragung der Daten der Auswerteelektronik angeschlossen ist.

[0012] Das mit einer erfindungsgemäßen Bildverarbeitungsvorrichtung durchgeführte Verfahren zur Bildverarbeitung, insbesondere für die Bilddaten eines supraauflösenden Mikroskops basiert darauf, dass von mindestens einem optoelektronischen Sensor Bilddaten ausgelesen werden und mit einer Recheneinrichtung zur Verarbeitung der Bilddaten Koordinaten der Maxima von Helligkeitsverteilungen in den Bilddaten bestimmt werden, wobei die Recheneinrichtung in den Bilddaten Helligkeitsmaxima anhand der Überhöhung der Helligkeitswerte von Pixeln relativ zu benachbarten Pixeln identifiziert und dann die Koordinaten eines Helligkeitsmaximas bestimmt, indem diese Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel bildet und diese Differenzen in geordneter Reihenfolge entsprechend der räumlichen Abfolge der Pixel verkettet, wobei die Recheneinrichtung weiterhin in einem Speicher eine Tabelle mit Koordinatenwerten speichert und einen Koordinatenwert aus der Tabelle anhand einer durch die verketteten Differenzwerte bestimmten Adresse ausliest.

[0013] Gemäß noch einem Aspekt der Erfindung sind eine Kamera, sowie eine bildverarbeitende Vorrichtung mit einer Kamera und einem an die Kamera angeschlossenen Rechner für ein supraauflösendes Mikroskop vorgesehen, welche mit entsprechenden Mitteln zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, beziehungsweise mit einer Auswerteelektronik zum Einsatz in einem supraauflösenden Mikroskop gemäß der Erfindung ausgestattet sind.

[0014] Die Kamera eines supraauflösenden Mikroskops gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung ist also eingerichtet, die Bilddaten bereits so auszuwerten, dass die ausgewerteten Daten die in hoher Auflösung lokalisierten Orte der Fluoreszenzemitter der untersuchten Probe enthalten. Die so erzeugten Daten enthalten

damit die wesentliche Bildinformation in komprimierter Form. Durch die interne Auswertung in der Kamera mit dem Mikrocontroller kann eine hohe Rechengeschwindigkeit erreicht werden, welche die Ermittlung der Fluoreszenzemitter in Superauflösung bereits im laufenden Betrieb ermöglicht.

[0015] Die Erfindung wird nachfolgend genauer und unter Bezugnahme auf die beigeschlossenen Figuren erläutert.

Figurenliste

[0016] Die Erfindung wird nachfolgend genauer anhand der beigeschlossenen Zeichnungen erläutert. Dabei verweisen gleiche Bezugszeichen in den Zeichnungen auf jeweils gleiche oder entsprechende Elemente. Es zeigen:

Fig. 1 einen schematischen Aufbau eines supraauflösenden Lichtmikroskops mit einer Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß der Erfindung,

Fig. 2 eine Weiterbildung eines supraauflösenden Lichtmikroskops mit einer Zylinderlinse,

Fig. 3 und **Fig. 4** Ausschnitte aus einer Matrix von Helligkeitswerten.

Fig. 5 Eine Matrix von Helligkeitswerten mit zwei Reihen von Pixeln zur Bestimmung von Ortskoordinaten von Fluoreszenzereignissen,

Fig. 6 eine durch die Helligkeitswerte der Pixel einer Reihe repräsentierte Helligkeitsverteilung,

Fig. 7 ein Pixel mit einem Ort eines Fluoreszenzereignisses,

Fig. 8 ein Pixel mit einem Sub-Binning,

Fig. 9 zwei Helligkeitsverteilungen,

Fig. 10 eine Weiterbildung eines Lichtmikroskops.

[0017] In **Fig. 1** ist eine Ausführungsform eines supraauflösenden Lichtmikroskops **1** mit einer erfindungsgemäßen Bildverarbeitungsvorrichtung in schematischer Darstellung gezeigt. Für die Erfindung ist dabei insbesondere ein nach dem Prinzip der Lokalisationsmikroskopie arbeitendes Mikroskop vorgesehen. Als Anregungsquelle zur Anregung einer Fluoreszenz ist allgemein, wie auch im dargestellten Beispiel ein Laser **5** geeignet. Denkbar ist generell auch, mehrere Laser oder Laserstrahlen zu verwenden, etwa um gleichzeitig oder auch in sequentieller Abfolge Licht verschiedener Wellenlängen auf die Probe **11** einzustrahlen. Die Probe **11** ist zur Untersuchung vor dem Objektiv **3** des Mikroskops **1** angeordnet. Ohne Beschränkung auf das dargestellte Beispiel kann ein dichroitischer Spiegel **9** vorgesehen sein, um den Laserstrahl **7** in den Strahlengang des Mikroskops einzukoppeln oder allgemeiner, um Fluoreszenzlicht und Laserlicht im Strahlengang des Mikroskops räumlich zu trennen. Das Objektiv **3** des Mikroskops **1** erzeugt ein vergrößertes, beziehungsweise mikroskopisches Bild des von der Probe **11** emittierten Fluoreszenzlichts **13**, welches vom optoelektronischen Sensor **19** der Kamera **15** aufgezeichnet wird. In der dargestellten Ausführungsform weist die Kamera **15** ein eigenes, zusätzliches Objektiv **16** auf. Dies ist jedoch nicht zwingend. Das Objektiv **3** des Mikroskops **1** kann auch direkt die Probe **11** auf dem Sensor **19** abbilden.

[0018] Mit der Kamera **15** ist ein Rechner **17** zur Auswertung und/oder Darstellung von Bilddaten der Kamera **15** verbunden. Eine Datenauswertung wird erfindungsgemäß aber auch schon von der Kamera **15** selbst durchgeführt. Neben der Ausleseelektronik **21** der Kamera **15**, die zum Auslesen der Signale des Sensors **19** vorzugsweise einen Analog-Digital-Konverter zur Umrechnung der Sensorsignale in Bitwerte, beziehungsweise allgemeiner in digitale Daten umfasst, weist die Kamera **15** dazu auch eine Auswerteelektronik **23** auf. Diese Auswerteelektronik **23** enthält einen oder mehrere Mikrocontroller **25**. Dieser steuert das Einlesen der Bilddaten von der Ausleseelektronik **21** und errechnet genaue Ortskoordinaten von Helligkeitsmaxima. Diese Helligkeitsmaxima entstehen im Allgemeinen durch lokalisierte Fluoreszenzemitter, die bei der supraauflösenden Mikroskopie insbesondere auch einzelne fluoreszierende Moleküle sein können. Deren Größe liegt also typischerweise weit unterhalb der optischen Auflösung des Mikroskops. Auf dem Sensor entsteht aus dem ursprünglichen, von der Probe emittierten, im wesentlichen punktförmigen Signal dann bestimmt durch die Punktspizfunktion des Mikroskops eine auf mehrere Pixel verteilte Helligkeitsverteilung. Die Auswerteeinrichtung ist nun im Speziellen mittels des entsprechend programmtechnisch eingerichteten Mikrocontrollers **25** eingerichtet, die ausgelesenen Helligkeitswerte mehrerer Pixel miteinander zu verrechnen, um als Ergebnis die Ortskoordinaten der Helligkeitsmaxima zu bestimmen. Diese Bestimmung kann bei der Berücksichtigung der Helligkeiten, beziehungsweise Farbwerte mehrerer Pixel genauer sein, als der Pixelabstand oder Pitch. Diese Ortskoordinaten werden dann als Daten für die Übertragung an den Rechner **17** bereitgestellt. Kamera

15 und Rechner **17** bilden eine Bildverarbeitungsvorrichtung **18** gemäß der Erfindung. Die Kamera **15** ist allgemein vorzugsweise als Einheit ausgebildet. Dabei sind der Sensor **16**, die Ausleseeinrichtung **21** und die Auswerteeinrichtung **23** mit dem Mikrocontroller **25** in einer Geräteeinheit zusammengefasst, beispielsweise können diese dazu in einem gemeinsamen Gehäuse **50** der Kamera **15** angeordnet sein.

[0019] Allgemein wird für eine Kamera eines superauflösenden Mikroskops als Mikrocontroller ein FPGA (FPGA=„field programmable gate array“) bevorzugt. Ein FPGA kann flexibel programmtechnisch eingerichtet werden, um individuell Routinen zur Ermittlung der Ortskoordinaten der Helligkeitsmaxima abzuarbeiten.

[0020] Die Erfindung zeichnet sich besonders auch durch zwei wesentliche funktionale Aspekte aus. Zum einen kann die sehr flexible und äußerst schnelle hardwarenahe Datenverarbeitung auf dem Microcontroller, wie etwa einem FPGA eine Echtzeitanalyse der bei diesen Verfahren anfallenden gigantischen Datenmengen ermöglichen. Bei der derzeit verfügbaren Technik stehen 10.000 Megapixel Verarbeitungskapazität bei 1 MHz Zeilenfrequenz und/oder einer Frame-Rate größer 1000/s und/oder einem Datentransfer mit mindestens 1 Gbit/s zur Verfügung. Aufgrund der Implementierung der Algorithmen auf dem Microcontroller in der Kamera **15** wird eine maximale Flexibilität erhalten, um zu einem späteren Zeitpunkt eine inkrementelle Optimierung der Algorithmen in der Hardware zu realisieren.

[0021] Zum zweiten wird durch das Konzept der Trefferidentifikation und durch das gezielte Ausschneiden der Rohdaten, eine massive Reduzierung des Speicherbedarfs erreicht ohne einen Datenverlust zu erleiden. Dieses Vorgehen gewinnt vor dem Hintergrund der Superresolutions-Mikroskopie, bei der gigantische Datenmengen anfallen, extrem an Bedeutung. Weiterhin wird durch die Datenreduktion eine Reduzierung der Rechnerlast in der Nachverarbeitung der Daten erreicht, wodurch auch auf dem Rechner **17** eine echtzeitnahe Nachbearbeitung der Daten ermöglicht wird.

[0022] Das Fluoreszenzsignal lokalisierter Fluoreszenz-Emitter, wie etwa von Einzelmolekülen lässt sich nicht nur lateral lokalisieren. Auch eine axiale Lokalisation ist möglich, wenn im Strahlengang des Mikroskops eine zylindrische Linse eingebaut wird. Diese führt dazu, dass die im Idealfall radialsymmetrische Abbildungsfunktion in Abhängigkeit davon elliptisch verzerrt wird, ob sich das zu lokalisierende Molekül ober- oder unterhalb der durch das Objektiv definierten Fokalebene befindet. **Fig. 2** zeigt schematisch eine entsprechende optische Anordnung. Das Objektiv **3** umfasst hier neben einem oder mehreren radialsymmetrisch fokussierenden optischen Elementen **26** eine Zylinderlinse **27**. Die Zylinderlinse **27** bewirkt eine astigmatische Verzerrung der Abbildung des Fluoreszenzemitters **12**. Die Abbildung stellt sich als Helligkeitsverteilung **30** auf dem optoelektronischen Sensor **19** dar. Die axiale Koordinate des Fluoreszenzemitters **30** korrespondiert zur Asymmetrie der Helligkeitsverteilung. Es ist allgemein nicht erheblich, wie der Astigmatismus des optischen Systems hervorgerufen wird. Deshalb kann in Verallgemeinerung einer Zylinderlinse zumindest ein astigmatisch verzerrendes optisches Element vorgesehen sein. In Weiterbildung der Erfindung ist dann dementsprechend vorgesehen, dass die Helligkeitsverteilung auf dem Sensor **19** mittels zumindest eines astigmatisch wirkenden optischen Elements im Strahlengang des Mikroskops **1** in der Sensorebene deformiert wird, wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung **18** dazu ausgebildet ist, aus der Deformation der Helligkeitsverteilung, wiederum unter Verrechnung der Helligkeitswerte mehrerer Pixel die Ortskoordinate des Fluoreszenzemitters **12** in axialer Richtung des Mikroskops **1**, beziehungsweise in Richtung entlang der optischen Achse des Mikroskops **1** zu bestimmen.

[0023] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beinhaltet die Bildverarbeitung eine Glättung der Helligkeitswerte. Dementsprechend ist die Bildverarbeitungsvorrichtung, vorzugsweise der Mikrocontroller eingerichtet, die Helligkeitswerte mehrerer benachbarter Pixel miteinander so zu verrechnen, dass für einen Pixel ein geglätteter Helligkeitswert erhalten wird. Die geglätteten Helligkeitswerte können dann zur Weiterverarbeitung zwischengespeichert werden. **Fig. 3** zeigt dazu als Ausführungsbeispiel einen Ausschnitt aus einer Matrix **32** der Helligkeitswerte. Jeder Matrixeintrag repräsentiert einen Pixel **20** des Sensors.

[0024] Um einen relevanten Pixel **34** wird gemäß einer Ausführungsform der Erfindung ein Gebiet **35** mit mehreren Pixeln gebildet, welches vorzugsweise auch den relevanten Pixel beinhaltet. Im dargestellten Beispiel ist das Gebiet eine 5×5 Submatrix, in deren Zentrum der relevante Pixel **34**, also der Pixel, für den ein geglätteter Helligkeitswert errechnet werden soll, liegt. Ohne Beschränkung auf eine bestimmte Form und/oder Größe des Gebiets können gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung die Errechnung des geglätteten Helligkeitswerts des relevanten Pixels die Addition der Helligkeitswerte der Pixel des Gebiets mittels des Mikrocontrollers umfasst. Der addierte Wert ist proportional zu einem Mittelwert der Helligkeit. Es ist daher nicht unbedingt notwendig, den Mittelwert auch tatsächlich zu errechnen. Um einen Überlauf oder eine Sättigung im verwendeten Zahlenformat zu vermeiden, kann aber eine Bit-Shift-Operation im Mikrocontroller durchgeführt werden. Eine solche Operation kann um Größenordnungen schneller durchgeführt werden, verglichen mit ei-

ner Division. Dies gilt insbesondere bei einer Implementation der Bildverarbeitung in einem Mikrocontroller. Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist daher die Bildverarbeitungsvorrichtung, vorzugsweise der Mikrocontroller eingerichtet, bei der Addition der Helligkeitswerte mehrerer Pixel mindestens eine Bit-Shift-Operation durchzuführen. Da die Differenzberechnung vorzugsweise vom Mikrocontroller durchgeführt wird, ist es zweckmäßig, in diesem Fall auch die vorgeordnete Glättung mit dem Mikrocontroller durchzuführen.

[0025] Naturgemäß weisen die Bilddaten aus einer ganzen Reihe von Gründen auch Helligkeitsschwankungen auf, die nicht auf die Fluoreszenz von Emittlern in der Probe zurückzuführen sind. Um eine effektive Reduktion der Bilddaten mit einer möglichst sicheren Extraktion tatsächlicher Fluoreszenzereignisse zu erzielen, ist dazu in Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung, vorzugsweise bereits der Mikrocontroller eingerichtet ist, die Bilddaten auf Fluoreszenz-Ereignisse zu überprüfen. Die Überprüfung wird vorzugsweise an den geglätteten Bilddaten durchgeführt. Zur Überprüfung, ob bei einem Pixel ein Fluoreszenz-Ereignis vorliegt, ist die Bildverarbeitungsvorrichtung dazu eingerichtet, den Helligkeitswert des betrachteten Pixels mit Helligkeitswerten mehrerer weiterer Pixel im Umkreis des betrachteten Pixels zu vergleichen und die Position eines Fluoreszenzemitters dann zu ermitteln, wenn der Helligkeitswert des betrachteten Pixels um einen ersten vorgegebenen Betrag höher ist, als die Helligkeitswerte einer ersten Gruppe weiterer Pixel im Umkreis des betrachteten Pixels und wenn die Helligkeitswerte der ersten Gruppe weiterer Pixel um einen zweiten vorgegebenen Betrag höher ist, als die Helligkeitswerte einer zweiten Gruppe von Pixeln, wobei die Pixel so ausgewählt werden, dass die Pixel der ersten Gruppe näher am betrachteten Pixel angeordnet sind, als die Pixel der zweiten Gruppe. Eine besonders sichere Erkennung ergibt sich dabei, wenn die Pixel der Gruppen ringförmig um den betrachteten Pixel angeordnet sind. **Fig. 4** zeigt hierzu als Beispiel wiederum einen Ausschnitt aus einer Matrix **32** der Helligkeitswerte. Jeder Matrixeintrag repräsentiert wie bei **Fig. 3** einen Pixel **20** des Sensors.

[0026] Für den relevanten Pixel **34** soll ermittelt werden, ob bei diesem ein Fluoreszenzereignis vorliegt, also ob ein Fluoreszenzemitter innerhalb des von diesem Pixel **34** abgebildeten Bereichs der Probe liegt. Dazu werden die Helligkeiten einer ersten Gruppe **36** und einer zweiten Gruppe **37** von Pixeln mit dem Helligkeitswert des betrachteten, beziehungsweise relevanten Pixels **34** verglichen. Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung sind wie auch im dargestellten Beispiel die Pixel **20** der ersten Gruppe direkte Nachbarn des betrachteten Pixels **34**. Weiterhin können gemäß noch einer Weiterbildung dieser Ausführungsform die Pixel **20** der zweiten Gruppe **37** direkte Nachbarn der Pixel **20** der ersten Gruppe **36** sein. Anders als in der Darstellung der **Fig. 4** ist es nicht unbedingt notwendig, die Helligkeitswerte aller ringförmig um den relevanten Pixel angeordneten weiteren Pixel der ersten und zweiten Gruppe **36, 37** zu verrechnen. Beispielsweise könnten die an den vier Ecken des quadratischen Rings der zweiten Gruppe angeordneten Pixel auch weggelassen werden.

[0027] Mindestens für den relevanten Pixel **34** wird vorzugsweise der geglättete Helligkeitswert verwendet. Da die Verrechnung der Helligkeitswerte der Pixel der ersten und zweiten Gruppe **36, 37** eine Mittelung mit sich bringt, können gegebenenfalls für die Helligkeitswerte hier auch die aus dem optoelektronischen Sensor **19** ausgelesenen, nicht geglätteten Werte verwendet werden.

[0028] Das vorstehend erläuterte Filterungsverfahren zur Diskriminierung von Fluoreszenzereignissen läuft nach einem Ausführungsbeispiel wie folgt ab: Ein Fluoreszenzereignis wird von der Bildverarbeitungsvorrichtung, insbesondere vom Mikrocontroller erkannt, beziehungsweise einem betrachteten Pixel **34** zugeordnet, wenn die Helligkeitsverteilung um den betrachteten Pixel **34** folgenden Bedingungen genügt:

[0029] a) der Helligkeitswert des betrachteten Pixels **34** überschreitet den mittleren Helligkeitswert (mittlere Intensität) der benachbarten Pixel (also der Pixel der Gruppe **36**) um einen vorbestimmten Helligkeitswert „BlobDifMinTop“, so dass gilt:

$$\text{int}(\text{center pixel}) > \text{average int}(\text{inner ring}) + \text{BlobDifMinTop}$$

[0030] Der Wert von BlobDifMinTop kann vom Benutzer festgelegt oder angepasst werden, da die Form und Intensität der Helligkeitsverteilung eines Ereignisses von den experimentellen Bedingungen, wie etwa der Probe oder den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen abhängen kann.

[0031] b) weiterhin wird vom Mikrocontroller geprüft, ob der mittlere Helligkeitswert des inneren Rings, also der Pixel der ersten Gruppe **36** den mittleren Helligkeitswert des äußeren Rings der benachbarten Pixel der zweiten Gruppe **37** um einen vorbestimmten Wert „BlobDifMinBottom“ übersteigt:

average int(inner ring) > average int(outer ring) + BlobDifMinBottom

[0032] Der Wert BlobDifMinBottom kann ebenso wie der Wert BlobDifMinTop vom Benutzer bestimmt oder angepasst werden.

[0033] Wenn ein Ereignis, also eine Fluoreszenzemission erkannt worden ist, kann dann eine Bestimmung der Ortskoordinaten des Ereignisses erfolgen.

[0034] Nachfolgend wird die in der Kamera **15** mittels des Mikrocontrollers vorgenommene Analyse der Bild-daten zur Bestimmung der Ortskoordinaten eines Fluoreszenzereignisses beschrieben. Die Analyse basiert darauf, die Koordinaten eines Helligkeitsmaximums zu bestimmen, indem diese Differenzen von Helligkeits-werten benachbarter Pixel bildet und diese Differenzen in geordneter Reihenfolge entsprechend der räumli-chen Abfolge der Pixel zu verketteten, wobei die Recheneinrichtung weiterhin einen Speicher mit einer darin ab-gelegten Tabelle mit Koordinatenwerten aufweist, wobei die Recheneinrichtung eingerichtet ist, einen Koordi-natenwert aus der Tabelle anhand einer durch die verketteten Differenzwerte bestimmten Adresse auszulesen.

[0035] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung ist der Mikrocontroller eingerichtet, eine durch die Hel-ligkeitswerte mehrerer Pixel gegebene Helligkeitsverteilung mit den Einträgen der Tabelle (im Folgenden auch als Lookup-Tabelle oder Umsetzungstabelle bezeichnet) zu vergleichen, wobei die Einträge der Lookup-Ta-belle eine Zuordnung von Helligkeitsverteilungen zu Ortskoordinaten repräsentieren, wobei der Mikrocontroller weiterhin eingerichtet ist, bei bester Übereinstimmung einer Helligkeitsverteilung eines Eintrags in der Lookup-Tabelle mit der Helligkeitsverteilung der mehreren Pixel die Ortskoordinate des Tabelleneintrags einem Fluo-reszenzereignis zuzuordnen. Es ist ebenso auch möglich, dass das Auslesen der Koordinatenwerte aus der Tabelle in einem von der Auswerteelektronik **23** getrennten Rechner **17** erfolgt. In diesem Fall können die von der Auswerteelektronik errechneten Differenzwerte oder aus den Differenzwerten bereits durch Verkettung gebildete Adressen an den Rechner **17** übertragen werden. Gemäß der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden vom Mikrocontroller die Differenzwerte berechnet und an den Rechner **17** übertragen.

[0036] Diese Zuordnung kann insbesondere dadurch geschehen, indem die Ortskoordinate in einen das Fluo-reszenzereignis beschreibenden Datensatz aufgenommen wird. Die Ortskoordinate kann auch durch einen Index repräsentiert werden. In diesem Fall können die Ortskoordinaten in der Lookup-Tabelle auch einfach durch die Reihenfolge der Datensätze gegeben und auslesbar sein.

[0037] Die Auswahl der Pixel erfolgt weiterhin insbesondere abhängig davon, dass einem Pixel oder einem Gebiet von Pixeln ein Fluoreszenzereignis zugeordnet wurde, dass also ein Fluoreszenzereignis in dem von einem betrachteten Pixel oder einem Gebiet mit dem Pixel abgebildeten Bereich der Probe **11** liegt.

[0038] Anhand von **Fig. 5** und **Fig. 6** wird ein Ausführungsbeispiel der Extraktion von Ortskoordinaten mittels einer Lookup-Tabelle beschrieben. Dem betrachteten Pixel **34**, beziehungsweise dem von diesem abgebilde-ten Bereich der Probe wurde zuvor ein Fluoreszenzereignis zugeordnet, wobei die Zuordnung vom Mikrocon-troller **25** wie anhand von **Fig. 4** beschrieben, vorgenommen worden sein kann.

[0039] Um zumindest eine Ortskoordinate mit hoher Auflösung zu bestimmen, werden allgemein Pixel **20** aus-gewählt, deren Helligkeiten eine Helligkeitsverteilung repräsentieren. Das Maximum der Helligkeitsverteilung gibt die gesuchte Ortskoordinate an. Typischerweise soll der Ort des Fluoreszenzereignisses in zwei Richtun-gen mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Dazu werden wie in **Fig. 5** gezeigt, zwei Mengen von Pixeln **20** ausgewählt, nämlich eine Reihe **38** von Pixeln in einer ersten Richtung (x-Richtung) und eine weitere Reihe von Pixeln in einer dazu nicht parallelen, vorzugsweise senkrechten Richtung (y-Richtung). Es ist günstig, wenn die Mengen wie im dargestellten Beispiel auch den relevanten Pixel **34** enthalten.

[0040] **Fig. 6** zeigt die durch die Helligkeitswerte **42** der Pixel einer Reihe, beispielsweise der Reihe **38** in x-Richtung repräsentierte Helligkeitsverteilung **40**. Der maximale Helligkeitswert **42** ist gemäß der zuvor durch-geführten Ereignis-Detektion gemäß **Fig. 4** der Helligkeitswert des betrachteten Pixels **34**.

[0041] Allgemein, ohne Beschränkung auf das dargestellte Beispiel ist es gemäß einer Weiterbildung der Er-findung günstig, wenn die Differenzen der Helligkeitswerte **42** betrachtet werden. Die Differenzen der Hellig-keitswerte **42** sind in **Fig. 6** mit diff.1, diff.2, diff.3 und diff.4 bezeichnet. Diese Differenzen werden dann von der Bildverarbeitungsvorrichtung mit den Einträgen der Lookup-Tabelle verglichen.

[0042] Die Tabelle ist so geordnet, dass ein Koordinatenwert an der Tabellenposition zu finden ist, die den zu einer Adresse verketteten Differenzwerten entspricht. Sind also beispielsweise die x-Werte in Spalten und die y-Werte in Reihen in der Tabelle angeordnet und wurden in x-Richtung die Differenzwerte diff.1, diff.2, diff.3 und diff.4 ermittelt, so würde in einem Beispiel die zugehörige x-Koordinate an der Spalte mit der Nummer stehen, die den verketteten Werten diff.1 | diff.2 | diff.3 | diff.4 entspricht. Das Auslesen von Tabelleneinträgen ist ein mit einem Rechner sehr schnell durchführbares Verfahren, ebenso die einfache Differenzbildung. Daher kann mit der Erfindung nicht nur die zu übertragende Datenmenge erheblich reduziert, sondern auch die Verarbeitung erheblich beschleunigt werden. Eine effektive Verarbeitung wird also insbesondere erzielt, wenn eine Auswerteelektronik mit einem Mikrocontroller vorgesehen wird, der die Schritte des Glättens, der Detektion von Fluoreszenzereignissen und der Bildung von Differenzen benachbarter Helligkeitswerte vornimmt. In einem praktischen Beispiel können so bei einem Mikroskopbild mit einer Größe von 2 Megapixel die zu übertragenden Daten bereits auf eine Menge in der Größenordnung von nur noch 600 Bytes reduziert werden.

[0043] Das den in der Lookup-Tabelle abgespeicherten Werten zugrundeliegende Modell der Helligkeitsverteilung kann variieren. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung sind die abgespeicherten Helligkeitsverteilungen in der Lookup-Tabelle nach Gauß-Verteilungen gebildet.

[0044] Generell können die Einträge der Lookup-Tabelle nach einer Ausführungsform der Erfindung benutzerseitig angepasst werden. Dazu wird gemäß einer Ausführungsform der Erfindung die Tabelle erzeugt, indem eine charakteristische Helligkeitsverteilung zugrunde gelegt und anhand der Helligkeitsverteilung für verschiedene Offsets der Verteilung die zugehörigen Differenzwerte errechnet und als Tabelleneinträge an der durch die Differenzwerte bestimmten Adressen eingetragen.

[0045] Wenn der Vergleich der Helligkeitswerte **42** mit der Lookup-Tabelle durchgeführt wurde, stehen die aus der Lookup-Tabelle ausgelesenen Ortskoordinaten zur Verfügung. **Fig. 7** zeigt als Beispiel das vom betrachteten Pixel **34** abgebildete Gebiet der Probe. Die ausgelesenen Offsets in x- und y-Richtung geben dann den Ort **45** des Fluoreszenzereignisses als Offset zur Mitte des Pixels, beziehungsweise des korrespondierenden Gebiets der Probe an. Der Offset, beziehungsweise allgemeiner die Ortskoordinate kann dabei auch in Form eines Index ausgelesen werden. Der Index gibt dann wie in **Fig. 8** dargestellt die Feldposition eines Sub-Pixels **48**, der dem Fluoreszenzereignis zugeordnet ist, in einem Raster aus Sub-Pixeln **45** an.

[0046] Die Ermittlung der Koordinaten anhand der Tabelle kann nach der Differenzbildung ohne weitere Bearbeitung erfolgen. Insbesondere ist eine Normierung gemäß einer Weiterbildung der Erfindung nicht notwendig. Die Differenzen sind an sich abhängig von der Lichtintensität. Zwei Fluoreszenzereignisse am gleichen Ort aber mit unterschiedlicher Intensität führen zu unterschiedlichen Differenzen, die sich um einen Helligkeitsfaktor unterscheiden. Auch die aus der Verkettung der Differenzen gebildeten Adressen sind unterschiedlich. **Fig. 9** zeigt zur Verdeutlichung zwei Helligkeitsverteilungen (a), (b), die sich durch die Gesamtintensität unterscheiden. Der Übersichtlichkeit halber ist in jedem Diagramm nur eine der Differenzen diff1, beziehungsweise diff1' bezeichnet. Die Helligkeitsverteilungen **40** unterscheiden sich durch die Gesamtintensität. Im dargestellten Beispiel sind alle Helligkeiten der Helligkeitsverteilung im Diagramm (b) um einen Faktor 1,5 höher als im Diagramm (a). Folglich gilt auch für die Differenzen $\text{diff1}' = 1,5 \cdot \text{diff1}$. Um eine rechenaufwändige Normierung oder die Berechnungen von Verhältnissen zu vermeiden, kann anstelle dessen für jeden dieser Fälle ein separater Tabelleneintrag vorgesehen werden. Auf den ersten Blick mag dies nachteilig erscheinen, da sich die Tabelle beträchtlich vergrößert. Allerdings wird die Berechnung der Koordinatenwerte gegenüber einer Variante mit normierten Werten vereinfacht und beschleunigt. Allgemein, ohne Beschränkung auf spezielle Beispiele ist daher in einer Weiterbildung der Erfindung vorgesehen, dass die Tabelle mehrere Tabelleneinträge mit gleichen Koordinatenwerten zu unterschiedlichen Differenzwerten, also folglich auch an unterschiedlichen Positionen aufweist. Diese gleichen Koordinatenwerte können dann insbesondere zu Helligkeitsverteilungen korrespondieren, die sich in ihrer Gesamthelligkeit unterscheiden.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, auch die zeitliche Information der Fluoreszenzsignale auszuwerten. Ein Beispiel dazu zeigt das in **Fig. 10** dargestellte Lokalisationsmikroskop. Das Ausführungsbeispiel basiert darauf, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung **18** allgemein dazu eingerichtet ist, die Zeitdifferenz zwischen einem Laserpuls und einem Fluoreszenzsignal zu messen. Dazu ist die Bildverarbeitungseinrichtung **18** mit einer Signalleitung verbunden, die mit dem Laser **5** synchronisiert ist. Die Verbindung kann eine Triggerleitung zum Schalten des Lasers **5** sein oder ein Triggersignal für den Laser abgreifen. Ebenso kann die Verbindung auch ein Signal eines Photodetektors führen, welcher das Laserlicht empfängt. Weiterhin umfasst die Kamera **15** einen Bildverstärker **51**. Der Bildverstärker **51** wandelt das Fluoreszenzlicht in eine Elektronenkaskade, die auf einem Schirm in ein optisches Signal konvertiert wird, welches wiederum vom optoelektronischen Sensor **19** erfasst wird. Vom Bildverstärker **51** kann ein durch die Elektronenkaskade verursachtes elektrisches Signal abgegriffen werden. Die Bildverarbeitungsvorrichtung **18** weist nun eine Zeitmesseinrich-

tung **52** auf, welche die Zeitdifferenz zwischen den beiden Signalen, also dem mit der Lichtabgabe des Lasers **5** korrelierten Signal und dem Signal des Bildverstärkers **51** misst. Mit einer solchen Messung können Fluoreszenzsignale zeitlich mit den anregenden Laserpulsen korreliert werden, um beispielsweise charakteristische Fluoreszenz-Lebensdauern zu ermitteln. Besonders bevorzugt ist die Zeitmesseinrichtung **52** wie dargestellt Bestandteil einer vom Rechner **17** getrennten Auswerteelektronik **23**.

[0047] Allgemein, ohne Beschränkung auf das spezielle dargestellte Beispiel ist in Weiterbildung der Erfindung also vorgesehen, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung eine Zeitmessvorrichtung **52** aufweist, welche eingerichtet ist, Zeitdifferenzen zwischen den Zeitpunkten von Lichtpulsen einer Anregungslichtquelle und Signalen von Elektronenkaskaden eines Bildverstärkers **51** in der Kamera **15** des Mikroskops **1** zu erfassen.

[0048] Die Zeitmesseinrichtung **51** kann beispielsweise einen Zeit-Digital-Wandler umfassen.

[0049] Die Zeitsignale können dann auch gegebenenfalls mit Bilddaten, also erfindungsgemäß detektierten Helligkeitsmaxima im Mikroskopbild korreliert werden.

Bezugszeichenliste

- 1** Superauflösendes Mikroskop
- 3** Objektiv von **1**
- 5** Laser
- 7** Laserstrahl
- 9** dichroitischer Spiegel
- 11** Probe
- 12** Fluoreszenzemitter
- 13** Fluoreszenzlicht
- 15** Kamera
- 16** Objektiv von **15**
- 17** Rechner
- 18** Bildverarbeitungsvorrichtung
- 19** Sensor von **15**
- 20** Pixel
- 21** Ausleseelektronik
- 23** Auswerteelektronik
- 25** Mikrocontroller
- 26** radialsymmetrisch fokussierendes optisches Element
- 27** Zylinderlinse
- 30** Helligkeitsverteilung auf **19**
- 32** Matrix der Helligkeitswerte
- 34** relevanter Pixel
- 35** Gebiet um **34**
- 36** erste Gruppe von Pixeln **20**
- 37** zweite Gruppe von Pixeln **20**
- 38** Reihe von Pixeln in x-Richtung
- 39** Reihe von Pixeln in y-Richtung
- 40** Helligkeitsverteilung

- 42 Helligkeitswert
- 45 Ort eines Fluoreszenzereignisses
- 47 Sub-Pixel
- 48 zu 45 zugeordnetes Sub-Pixel
- 50 Gehäuse von 15
- 51 Bildverstärker
- 52 Zeitmesseinrichtung

Patentansprüche

1. Bildverarbeitungsvorrichtung (18), insbesondere für die Bilddaten eines supraauflösenden Mikroskops, welche eine Recheneinrichtung zur Verarbeitung der Bilddaten aufweist, die eingerichtet ist, Koordinaten der Maxima von Helligkeitsverteilungen Bilddaten mit einer Genauigkeit zu bestimmen, die höher als der Pixelabstand ist, wobei die Recheneinrichtung eingerichtet ist, in den Bilddaten Helligkeitsmaxima anhand der Überhöhung der Helligkeitswerte von Pixeln relativ zu benachbarten Pixeln zu bestimmen, und wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung weiterhin eingerichtet ist, die Koordinaten eines Helligkeitsmaximas zu bestimmen, indem diese Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel bildet und diese Differenzen in geordneter Reihenfolge entsprechend der räumlichen Abfolge der Pixel zu verketteten, wobei die Recheneinrichtung weiterhin einen Speicher mit einer darin abgelegten Tabelle mit Koordinatenwerten aufweist, wobei die Recheneinrichtung eingerichtet ist, einen Koordinatenwert aus der Tabelle anhand einer durch die verketteten Differenzwerte bestimmten Adresse auszulesen.
2. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß dem vorstehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Speicher eine zweidimensionale Tabelle enthält, wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung dazu eingerichtet ist, Differenzen von Helligkeitswerten entlang zweier unterschiedlicher Richtungen zu bilden, für jede Richtung die Differenzen zu einer Adresse zu verketteten und aus der Tabelle die Koordinaten der Raumrichtungen an der durch die beiden Adressen bestimmten Position auszulesen.
3. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung eine Auswerteelektronik (23) mit zumindest einem Mikrocontroller (25) umfasst, welcher eingerichtet ist, zumindest die Berechnung der Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel durchzuführen.
4. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß dem vorstehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung neben der Auswerteelektronik (23) einen Rechner (17) umfasst und die Auswerteelektronik (23) in einer Kamera (15) integriert ist, die an den Rechner (17) zur Übertragung der Daten der Auswerteelektronik (23) angeschlossen ist.
5. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Mikrocontroller (25) einen FPGA umfasst.
6. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung eingerichtet ist, die Helligkeitswerte mehrerer benachbarter Pixel (20) miteinander so zu verrechnen, dass für einen Pixel (34) ein geglätteter Helligkeitswert erhalten wird.
7. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Mikrocontroller (25) eingerichtet ist, die Bilddaten auf Fluoreszenz-Ereignisse zu überprüfen, indem dieser den Helligkeitswert eines betrachteten Pixels mit Helligkeitswerten mehrerer weiterer Pixel im Umkreis des betrachteten Pixels zu vergleichen und die Position eines Fluoreszenzemitters dann zu ermitteln, wenn der Helligkeitswert des betrachteten Pixels um einen ersten vorgegebenen Betrag höher ist, als die Helligkeitswerte einer ersten Gruppe von Pixeln im Umkreis des betrachteten Pixels und wenn die Helligkeitswerte der ersten Gruppe von Pixeln um einen zweiten vorgegebenen Betrag höher ist, als die Helligkeitswerte einer zweiten Gruppe von Pixeln, wobei die Pixel so ausgewählt werden, dass die Pixel der ersten Gruppe näher am betrachteten Pixel angeordnet sind, als die Pixel der zweiten Gruppe.

8. Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Tabelle mehrere Tabelleneinträge mit gleichen Koordinatenwerten zu unterschiedlichen Differenzwerten aufweist.

9. Superauflösendes Mikroskop (1), mit

- einer Anregungsquelle zur Anregung von Fluoreszenzlicht in einer mit dem Mikroskop (1) zu untersuchenden und vor einem Objektiv (3) des Mikroskops (1) angeordneten Probe (11),
- einer Kamera (15) mit einem optoelektronischen Sensor (19) zur Aufzeichnung des mikroskopischen Bilds des durch Fluoreszenzanregung von der Probe emittierten Lichts, und
- eine Bildverarbeitungsvorrichtung gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, welche mit dem Sensor verbunden ist, um aus dem Sensor ausgelesene Bilddaten zu verarbeiten und die Koordinaten von Helligkeitsmaxima zu bestimmen.

10. Superauflösendes Mikroskop (1) gemäß dem vorstehenden Anspruch, **gekennzeichnet durch** zumindest ein astigmatisch wirkendes optisches Element im Strahlengang des Mikroskops (1), welches die Helligkeitsverteilung auf dem Sensor (19) deformiert, wobei die Bildverarbeitungsvorrichtung (18) dazu ausgebildet ist, aus der Deformation der Helligkeitsverteilung unter Verrechnung der Helligkeitswerte mehrerer Pixel die Ortskoordinate des Fluoreszenzemitters (12) in axialer Richtung des Mikroskops (1) zu bestimmen.

11. Superauflösendes Mikroskop gemäß einem der zwei vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung (18) eine Zeitmessvorrichtung (52) aufweist, welche eingerichtet ist, Zeitdifferenzen zwischen den Zeitpunkten von Lichtpulsen einer Anregungslichtquelle und Signalen von Elektronenkaskaden eines Bildverstärkers (51) in der Kamera (15) des Mikroskops (1) zu erfassen.

12. Verfahren zur Bildverarbeitung, insbesondere für die Bilddaten eines suprauflösenden Mikroskops bei welchem von mindestens einem optoelektronischen Sensor (19) Bilddaten ausgelesen werden und mit einer Recheneinrichtung zur Verarbeitung der Bilddaten Koordinaten der Maxima von Helligkeitsverteilungen in den Bilddaten bestimmt werden, wobei die Recheneinrichtung in den Bilddaten Helligkeitsmaxima anhand der Überhöhung der Helligkeitswerte von Pixeln relativ zu benachbarten Pixeln identifiziert und dann die Koordinaten eines Helligkeitsmaximas bestimmt, indem diese Differenzen von Helligkeitswerten benachbarter Pixel bildet und diese Differenzen in geordneter Reihenfolge entsprechend der räumlichen Abfolge der Pixel verkettet, wobei die Recheneinrichtung in einem Speicher eine Tabelle mit Koordinatenwerten speichert und einen Koordinatenwert aus der Tabelle anhand einer durch die verketteten Differenzwerte bestimmten Adresse ausliest.

13. Verfahren gemäß dem vorstehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung die Helligkeitswerte mehrerer Pixel des Sensors (19) verrechnet, so dass eine Glättung des Helligkeitswerts eines Pixels (34) erhalten wird.

14. Verfahren gemäß dem vorstehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Errechnung des geglätteten Helligkeitswerts eines Pixels (34) die Addition der Helligkeitswerte der Pixel (20) eines Gebiets (35) mit mehreren Pixeln (20) umfasst.

15. Verfahren gemäß dem vorstehenden Anspruch, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bildverarbeitungsvorrichtung bei der Addition der Helligkeitswerte mehrerer Pixel mindestens eine Bit-Shift-Operation durchführt.

16. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Tabelle erzeugt wird, indem eine charakteristische Helligkeitsverteilung zugrundegelegt und anhand der Helligkeitsverteilung für verschiedene Offsets der Helligkeitsverteilung die zugehörigen Differenzwerte errechnet und als Tabelleneinträge an der durch die Differenzwerte bestimmten Adressen eingetragen werden.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

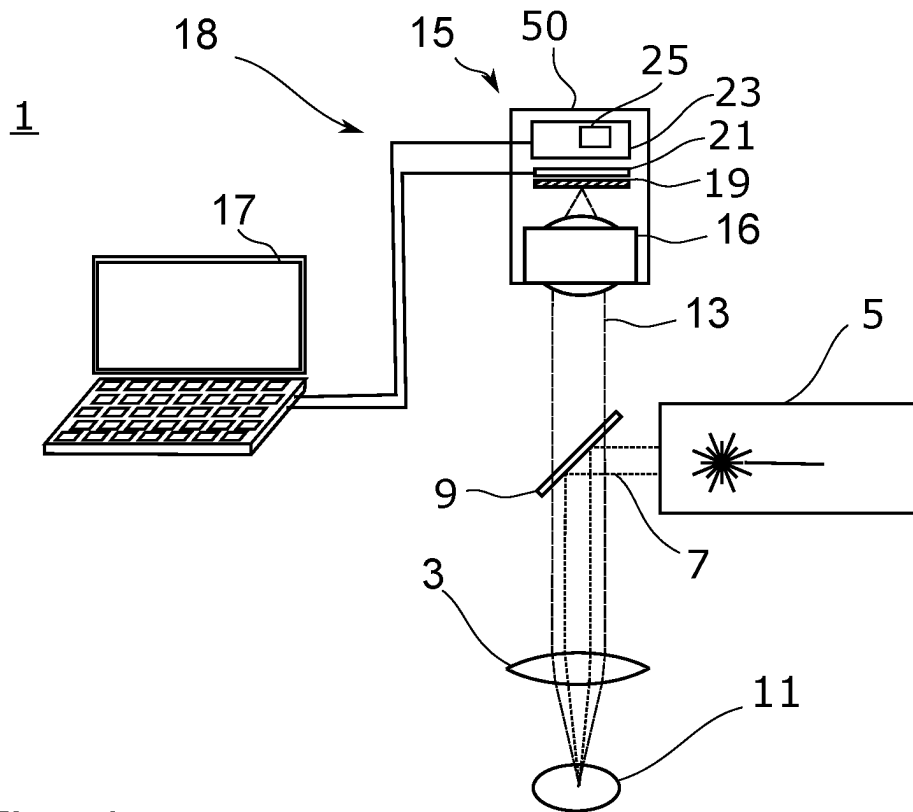


Fig. 1

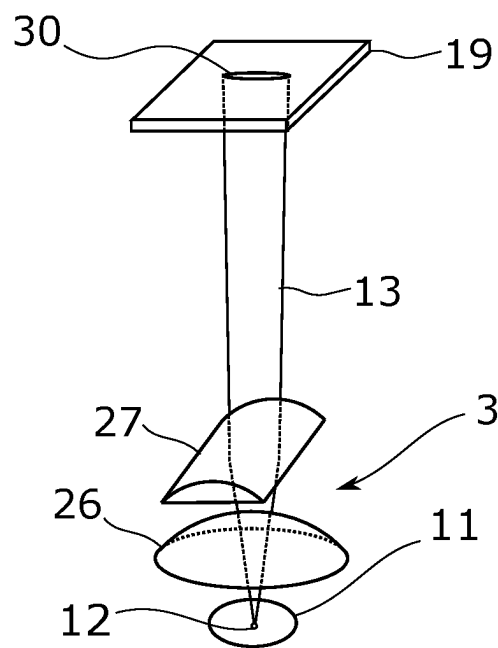


Fig. 2

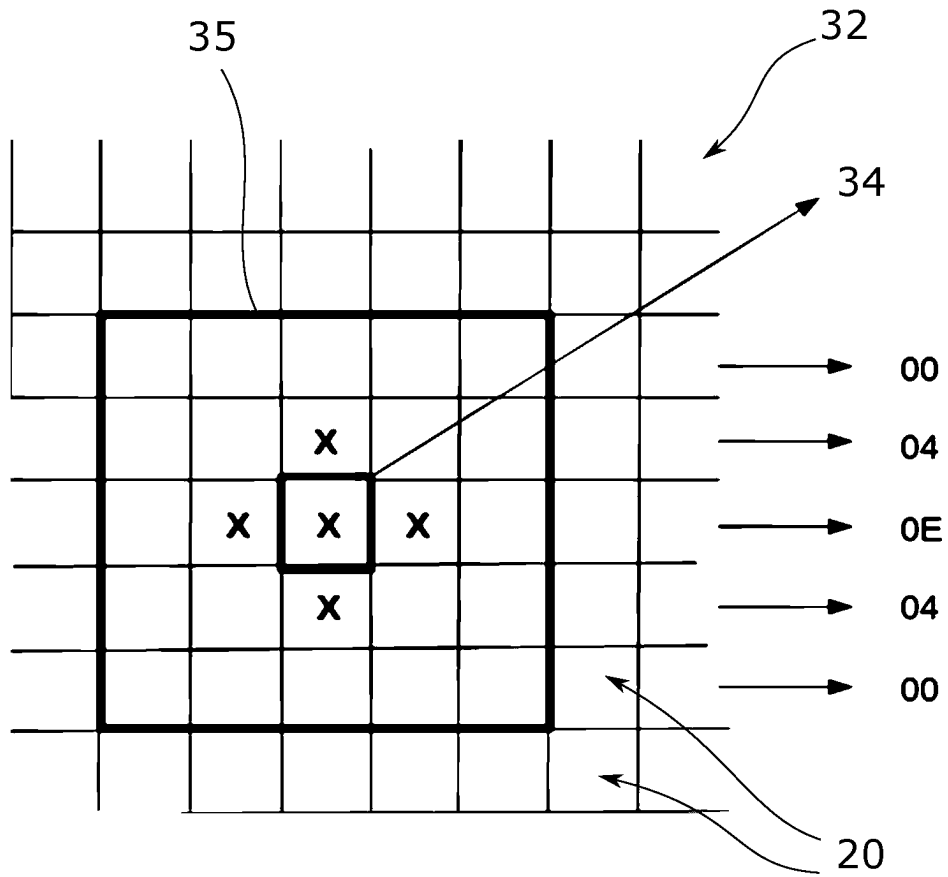


Fig. 3

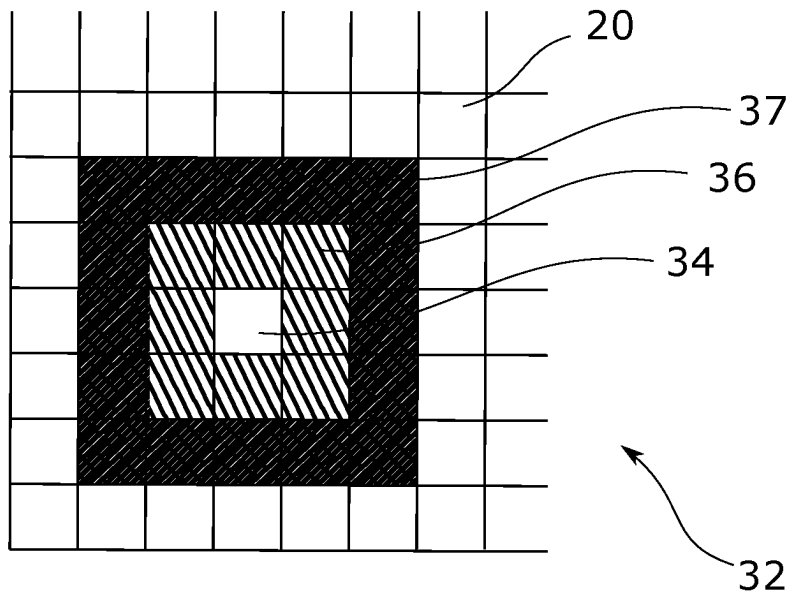


Fig. 4

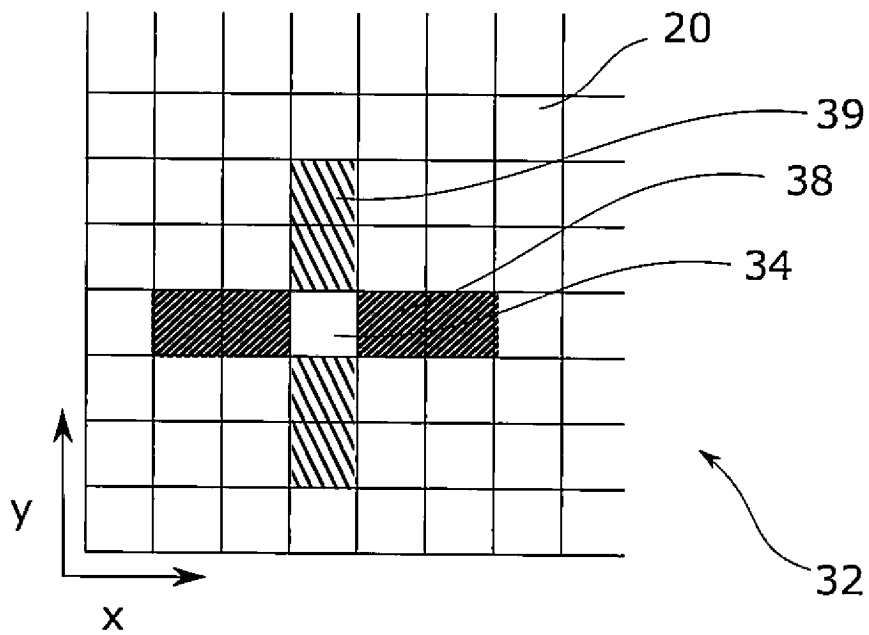


Fig. 5

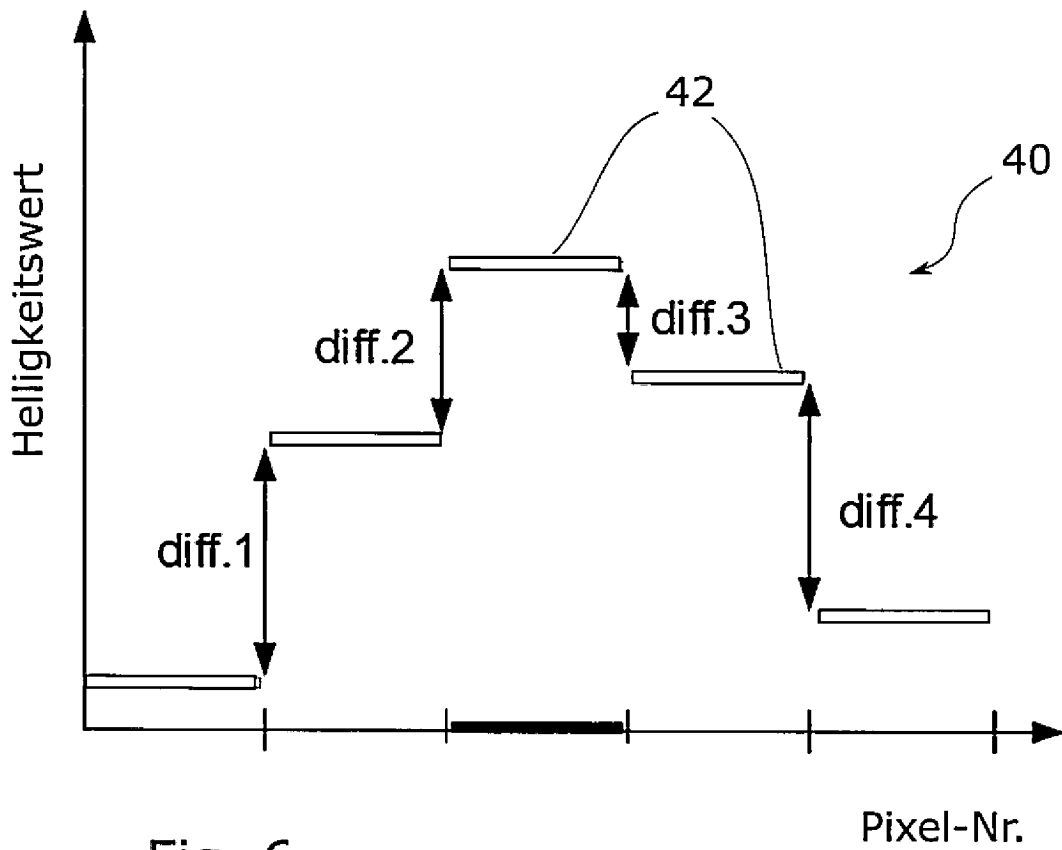


Fig. 6

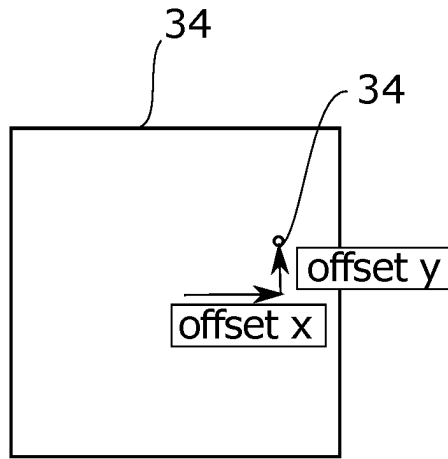


Fig. 7

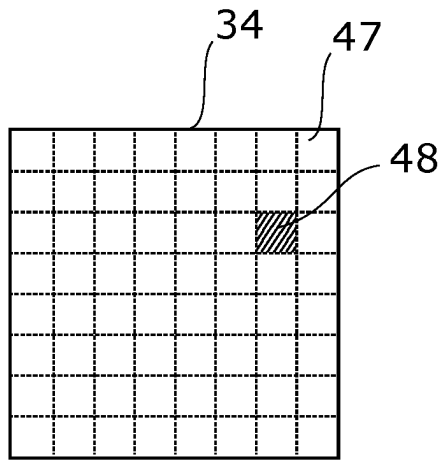


Fig. 8

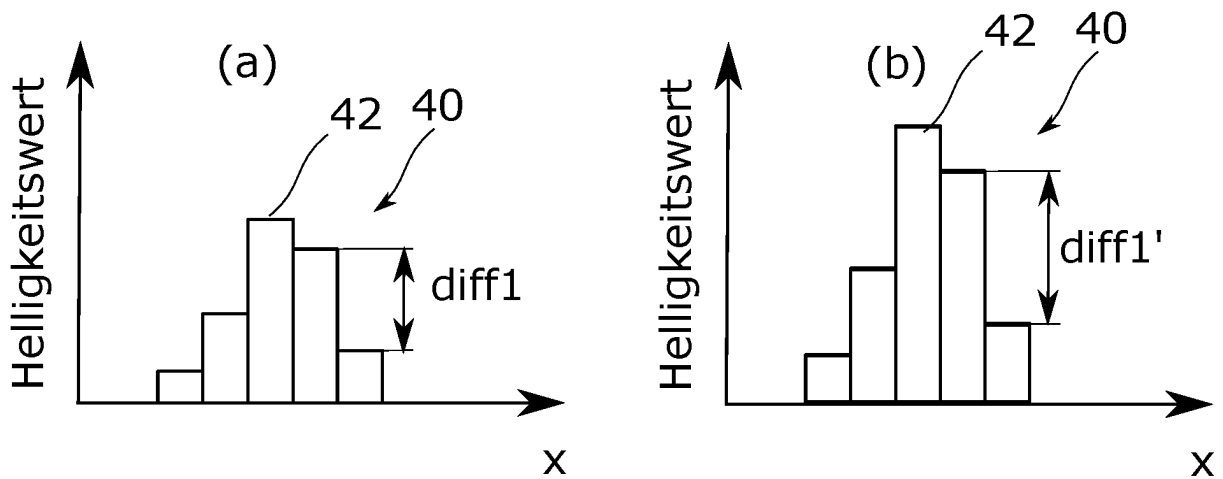


Fig. 9

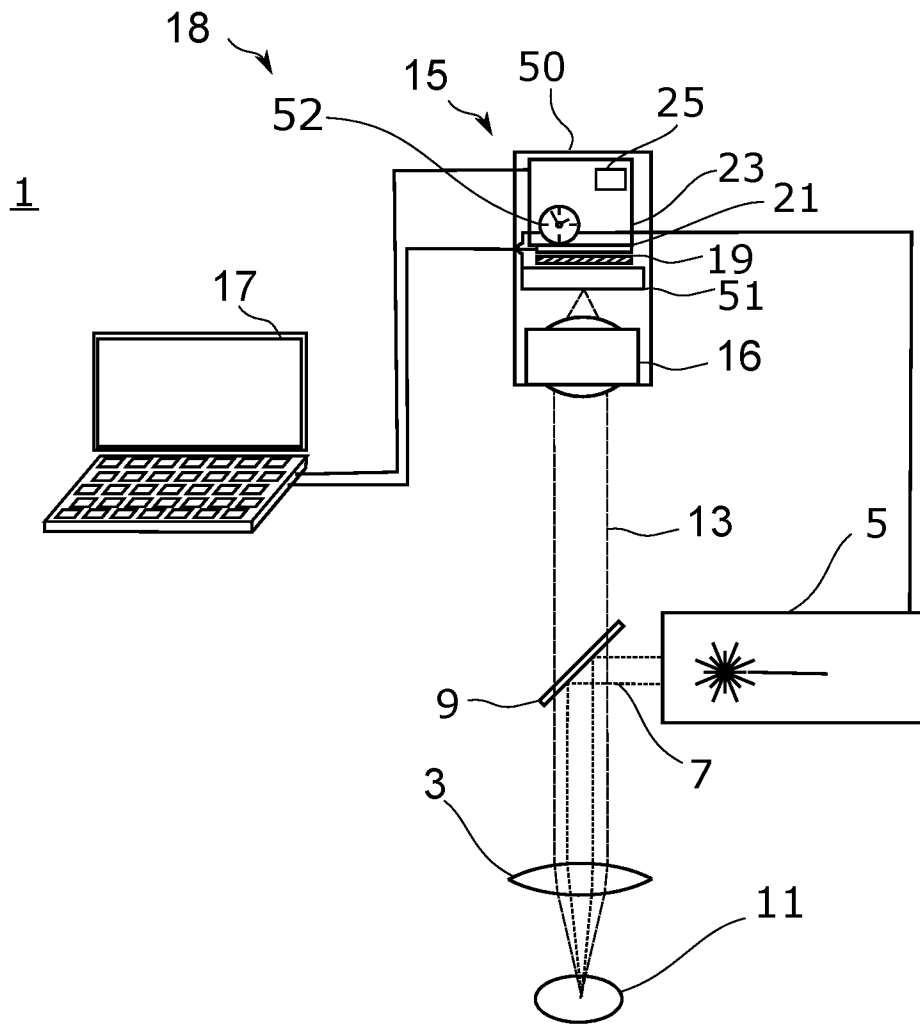


Fig. 10