

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 873 448**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2019 E 19180580 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2021 EP 3591403**

54 Título: **Procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida con el uso de una micromatriz de antígeno**

30 Prioridad:

06.07.2018 EP 18182266

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

03.11.2021

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**MORGENROTH, KATJA;
VIERTEL, VANESSA;
STELLER, ULF;
GERLACH, STEFAN;
MARZAHN, CHRISTIAN;
VOIGT, JÖRN y
STÖCKER, WINFRIED**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 873 448 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida con el uso de una micromatriz de antígeno

5 La invención se refiere a un procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida por medio del uso de una micromatriz de antígeno así como una micromatriz de antígeno correspondiente para ello.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida.

10 La invención se refiere asimismo a un dispositivo para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida.

La invención se refiere asimismo a un dispositivo de red de datos para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida.

15 La invención se refiere asimismo a un producto de programa informático, que comprende comandos que con la ejecución del programa por un ordenador hacen que este realice un procedimiento para el procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida.

La invención se refiere asimismo a una señal portadora de datos que transmite el producto de programa informático.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para producir una micromatriz de antígeno.

La invención se refiere asimismo a un portaobjetos con una pluralidad de micromatrices de antígeno.

20 La invención se refiere asimismo a un kit para su uso en un procedimiento para detectar anticuerpos en una muestra que presenta al menos una micromatriz de antígeno.

En el sentido de esta solicitud, una muestra biológica líquida puede denominarse también una muestra de paciente líquida de un paciente. Un ejemplo de una muestra de paciente líquida es una muestra de paciente líquida que presenta componentes sanguíneos. En particular, la muestra de paciente líquida puede ser un suero sanguíneo.

25 Son conocidos procedimientos de diagnóstico en los que por medio de antígenos se detecta una presencia de anticuerpos en una muestra biológica líquida tal como, por ejemplo, suero sanguíneo. Para ello se usan sustratos, también denominadas micromatrices, sobre cuya superficie se aplican antígenos en forma de gotas de gel o manchas. Las gotas o manchas se secan en la superficie de sustrato después de la aplicación. Para detectar si están presentes anticuerpos de un tipo determinado en una muestra de paciente biológica líquida, las manchas se incuban en primer lugar con la muestra, en la que entonces, en función del tipo de antígenos y el tipo de anticuerpos, puede producirse una unión de anticuerpos a antígenos. En un procedimiento de este tipo, los anticuerpos de la muestra a veces se denominan primeros anticuerpos. A continuación, tiene lugar entonces una incubación de las manchas con un conjugado que presenta segundos anticuerpos, que a su vez están marcados con un colorante. Los segundos anticuerpos se unen entonces a los primeros anticuerpos, de modo que entonces por medio de una detección de una coloración de las manchas por el colorantes puede detectarse indirectamente una unión de los primeros anticuerpos a los antígenos con el fin de obtener información sobre si los primeros anticuerpos de un tipo determinado están o estaban contenidos en la muestra. El colorante puede ser en este sentido por ejemplo un colorante fluorescente.

40 El documento WO 2012/094427 A1 desvela procedimientos para la detección de fluorescencia de anticuerpos mediante detección de fluorescencia. El documento US 2005/0124017 desvela la obtención de imágenes de fluorescencia para la detección de proteínas, anticuerpos, fármacos u otros ligandos en una muestra, explorándose una imagen. El documento US 2004/0253640 desvela una micromatriz con proteínas impresas sobre la misma para detectar una proteína diana mediante inmunofluorescencia. El documento WO 2017/025954 A1 desvela una micromatriz de antígeno para la detección de inmunofluorescencia, en la que se explora la micromatriz de antígeno para la detección. El documento WO 2012/052994 A2 desvela micromatrices para la caracterización de alto rendimiento de la respuesta inmunitaria. El documento WO 2012/037369 A desvela la detección de anticuerpos mediante detección de fluorescencia. El documento WO 2004/027379 A desvela una técnica de bolas rodantes para detectar anticuerpos primarios que están unidos sobre una micromatriz de antígeno. El documento WO 2000/063701 A2 desvela micromatrices de polipéptidos para detectar por ejemplo anticuerpos, usándose detección de fluorescencia y explorándose las micromatrices. El documento WO 2011/101487 A1 desvela un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades a través de una detección simultánea de anticuerpos que están unidos a sustratos sintéticos y celulares, detectándose los anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta. Un sustrato sintético es una micropartícula o una esfera que está revestida con un antígeno nativo purificado o un antígeno recombinante, un microscopio de fluorescencia está equipado con una cámara y un sistema de exploración. El documento EP 2 362 222 desvela un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades, detectándose simultáneamente anticuerpos que están unidos a sustratos celulares o tisulares, o que están unidos a sustratos sintéticos, tales como, por ejemplo,

micropartículas o esferas que están revestidas con los antígenos específicos. A este respecto se usa microscopía de fluorescencia multicolor para detectar los anticuerpos unidos, presentando los sustratos y los anticuerpos unidos distintos colores de fluorescencia.

Se conoce por el estado de la técnica, tal como, por ejemplo, por el documento US 2017 001 60 52, que las manchas de antígeno pueden presentar un denominado primer colorante que es visible en un primer canal de color. El colorante con el que está marcado el segundo anticuerpo, se denomina entonces como el denominado segundo colorante, que a su vez es visible en un segundo canal de color. Para la detección de posición, se disponen en este sentido en el estado de la técnica todas las manchas en forma de una cuadrícula regular correspondientemente a un patrón de tablero de ajedrez, en la que diferentes manchas presentan diferentes antígenos. Por medio del primer colorante, las manchas se pueden reconocer con respecto a su posición o su ubicación sobre el sustrato en una primera imagen del primer canal de color, dado que el primer colorante está presente o es visible independientemente de la unión de anticuerpos de la muestra con antígenos de las manchas. Por lo tanto, en la primera imagen del primer canal de color todas las manchas que presentan el primer colorante se pueden reconocer en su posición o ubicación. Basándose en la primera imagen, se alinea entonces una cuadrícula con respecto a la imagen o con respecto a todas las manchas de modo que los campos individuales de la cuadrícula detectan en cada caso exactamente una mancha. Esta cuadrícula rígida por lo tanto requiere una alineación precisa en todos los campos con respecto a las manchas de un patrón rígido. Una vez adaptada la cuadrícula a la primera imagen, de esta manera, por medio de la posición de cuadrícula individual o la posición de campo individual dentro de la cuadrícula se puede establecer o indicar entonces basándose en la información de datos asociada, qué mancha determinada reconocida de qué campo determinado porta qué antígeno exacto. Por lo tanto, una determinada mancha de antígeno con un determinado antígeno siempre tiene que reconocerse exactamente en un campo determinado de la cuadrícula para poder efectuar dicha asignación de antígeno sin errores. Una información de posición obtenida en la imagen del primer canal de color para una mancha se puede usar entonces con respecto a una imagen del segundo canal de color para establecer si una coloración por el segundo colorante en esa misma posición indica una unión de primeros anticuerpos a un tipo de antígeno determinado.

Por el documento WO 2012/142397 A2 se conoce un sistema en el que sobre un soporte está prevista una micromatriz, estando dispuestas todas las manchas individuales en un patrón continuamente regular individual de modo que todas las tienen el mismo tamaño y todas tienen la misma distancia entre sí.

En la figura 1 se representa a modo de ejemplo una micromatriz de antígeno AC conocida por el estado de la técnica con manchas de antígeno AS para una zona de imagen registrada B para un primer canal de color o primer colorante. Se representa asimismo una cuadrícula R que se va a generar o a reconocer. La micromatriz AC porta un patrón de manchas SM. Se supone que la mancha de antígeno ASX porta un antígeno diferente que la mancha de antígeno ASY. La mancha de antígeno superior izquierda ASX, tiene encontrarse por lo tanto en el campo superior izquierdo FX de la cuadrícula, de modo que puede tener lugar correctamente una asignación a un antígeno determinado.

La figura 2 muestra una configuración en la que sobre el sustrato de la micromatriz AC no tuvo lugar ninguna disposición espacial precisa o exacta de las manchas AS. Por lo tanto, la mancha ASX solo está presente parcialmente sobre la micromatriz CA y en la zona de imagen B, de modo que la cuadrícula R, si bien podría detectarse en sí, en cambio puede producir una alineación errónea de los campos FX, FY con respecto a las manchas ASX, ASY. Por lo tanto, una asignación de un tipo de antígeno a la mancha ASY basándose en el campo de cuadrícula FX asignado a la mancha ASY sería defectuosa y entonces también una detección de unión con respecto a una unión de anticuerpos de la muestra biológica a un antígeno específico. Esta detección errónea existiría en particular cuando todo el patrón de manchas SM se repitiera repetidamente en la dirección de RI en el marco de un proceso de producción, de modo estaría presente una mancha de antígeno ASX2 que portaría el mismo antígeno que la mancha ASX. Es decir, en el marco de un proceso de producción, todo el patrón de manchas SM tendría que colocarse con mucha precisión sobre la micromatriz AC para evitar una asignación errónea de tipos de antígeno a manchas de antígeno ASX, ASY, ASZ. Es decir, el estado de la técnica requiere una alta precisión en el transcurso de la producción del sustrato o micromatriz de antígeno que porta diferentes manchas de antígeno con diferentes tipos de antígeno. La micromatriz de antígeno conocida por el estado de la técnica es asimismo sensible a una desviación de una posición de manchas de antígeno tales como, por ejemplo, las manchas ASZ, ASW del patrón SM.

Por lo tanto, se propone un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida por medio del uso de una micromatriz de antígeno así como una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención correspondiente.

La micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención presenta una superficie de sustrato plana con manchas de antígeno aplicadas separadas entre sí, que presentan un colorante igual común. Este colorante se puede denominar también primer colorante. Las manchas de antígeno forman en este sentido respectivas cantidades de manchas de antígeno que forman patrones de manchas de antígeno regulares respectivos, presentando manchas de antígeno de una cantidad de manchas de antígeno igual, un tipo de antígeno común. En este sentido, dos o más de las cantidades de manchas de antígeno presentan diferentes tipos de antígeno. La micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención se caracteriza porque sobre la superficie de sustrato están aplicadas asimismo manchas de

referencia que presentan asimismo el mismo colorante común. Las manchas de referencia forman una cantidad de manchas de referencia que a su vez forma un patrón de referencia regular, en particular a lo largo de una dirección de disposición en la que los patrones se suceden. El patrón de referencia se diferencia en cuanto a su regularidad de los patrones de manchas de antígeno o de las regularidades de los patrones de manchas de antígeno.

5 La micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención se utiliza entonces en el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida. El mismo colorante común puede denominarse en este sentido también primer colorante. En el transcurso del procedimiento, las manchas de la micromatriz de antígeno se incuban en primer lugar con la muestra biológica. Asimismo, las manchas se incuban con un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante. Con ello, en determinadas manchas de antígeno pueden resultar las uniones descritas anteriormente de los anticuerpos secundarios y, por lo tanto, también del segundo colorante, en función del tipo de antígeno de una mancha de antígeno y en función del anticuerpo primario contenido en la muestra. En el transcurso del procedimiento, se adquiere o proporciona una primera información de imagen que representa una coloración de las manchas de referencia y las manchas de antígeno por el primer colorante. Basándose en la al menos una primera información de imagen, tiene lugar entonces una detección del patrón de referencia así como de una posición de referencia asociada al patrón de referencia. Asimismo, basándose en la al menos una primera información de imagen, tiene lugar entonces una detección de los patrones de manchas de antígeno respectivos así como de posiciones adicionales asociadas respectivas. Además, basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, tiene lugar una creación de una información de asignación, que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos. Por último, tiene lugar una adquisición o provisión de una segunda información de imagen que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno por el segundo colorante. Finalmente, basándose en la segunda información de imagen y la información de asignación, tiene lugar una determinación de dimensiones de unión respectivas que indican uniones respectivas de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.

25 En particular, el patrón de referencia y el patrón de antígeno están dispuestos a lo largo de una dirección de disposición de los patrones, presentando asimismo, en particular, el patrón de referencia y el patrón de antígeno direcciones de propagación respectivas que discurren esencialmente en perpendicular a la dirección de disposición de los patrones.

30 El patrón de referencia y el patrón de manchas de antígeno presentan preferentemente direcciones de propagación respectivas que discurren en perpendicular a una dirección de disposición de los patrones. Las direcciones de propagación de los patrones discurren preferentemente de manera esencialmente paralela entre sí.

Sobre la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención, las manchas de antígeno así como las manchas de referencia presentan el mismo colorante común, que es visible en un primer canal de color que preferentemente es un denominado canal rojo.

35 La micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención y el procedimiento de acuerdo con la invención consiguen una o varias de las ventajas mencionadas ahora a continuación, para lo cual se ofrecen explicaciones detalladas a continuación.

Debido a que la micromatriz de antígeno presenta manchas de referencia que forman un patrón de referencia regular propio, que se diferencia en cuanto a su regularidad de los patrones de manchas de antígeno de las manchas de antígeno, es posible detectar una posición o ubicación del patrón de referencia en el primer canal de color o la primera información de imagen. Dado que los patrones de manchas de antígeno se diferencian en su tipo de patrón o su regularidad del patrón de referencia, los patrones de manchas de antígeno pueden detectarse por separado en cuanto a su posición o ubicación sobre la superficie de sustrato. Entonces se puede establecer qué patrón de manchas de antígeno presenta qué tipos de antígeno, dado que la posición de referencia del patrón de referencia indica en relación con otras posiciones de los patrones de manchas de antígeno adicionales, desde dónde o desde qué posición sigue una sucesión de patrones de manchas de antígeno en una dirección de disposición de los patrones sobre la superficie de sustrato. Es decir, un patrón de manchas de antígeno determinado con un tipo de antígeno determinado no tiene que estar dispuesto en un sitio totalmente determinado de la imagen o de la superficie de sustrato. Más bien, es suficiente que un patrón de manchas de antígeno esté dispuesto en una posición determinada con respecto a la posición de referencia del patrón de referencia a lo largo de una dirección de disposición de los patrones. Una creación de información de asignación, que indica una asignación patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno, puede tener lugar, por ejemplo, porque se proporciona un conjunto de datos que indica dicha asignación de este tipo en función de una posición del patrón de manchas de antígeno a una posición del patrón de referencia. Con ello el procedimiento de acuerdo con la invención se vuelve especialmente robusto, dado que únicamente es necesario disponer las manchas de antígeno de una cantidad de manchas de antígeno determinada como un patrón de manchas de antígeno de tal manera que el patrón correspondiente esté lo suficientemente separado de otros patrones, por ejemplo en su posición. En la solución según el estado de la técnica, las manchas de antígeno no forman ningún patrón regular propio, sino que están dispuestas en una especie de procedimiento de tablero de ajedrez en distintas posiciones, siendo una asignación de un tipo de antígeno determinado a manchas muy sensible para la alineación individual de las manchas sobre la superficie de sustrato o una imagen.

Por lo tanto, la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención es especialmente ventajosa, dado que, tal como se ha descrito anteriormente, únicamente es importante la sucesión del patrón de referencia y del patrón de manchas de antígeno en la dirección de disposición o a lo largo de la dirección de disposición de los patrones sobre la superficie de sustrato, de modo que el patrón de referencia y los patrones de manchas de antígeno adicionales únicamente tienen que aparecer en una sucesión ordenada uno encima de otro a lo largo de la dirección de disposición. Esto tiene ventajas particulares en el transcurso de un proceso de producción, dado que al aplicarse la totalidad de los patrones de manera periódica, recurrente o repetitiva, es decir, de modo que la totalidad de los patrones se repite periódicamente uno tras otro, el soporte de sustrato no tiene que separarse o fragmentarse exactamente en el sitio en el que se repite la totalidad de los patrones para producir varias micromatrices de antígeno con, en cada caso, la totalidad de los patrones. Únicamente es necesario que todas las cantidades de manchas de antígeno deseadas o patrones de manchas de antígeno y el patrón de referencia o la cantidad de manchas de referencia se produzcan en cada caso al menos una vez en la micromatriz de antígeno que se va a producir. Una totalidad de este tipo de patrones o una sucesión de este tipo de estos patrones de manchas de antígeno y del patrón de referencia resulta habitualmente a lo largo de una distancia predeterminada a lo largo de la dirección de disposición de los patrones en el soporte de sustrato. En el caso de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención, esta distancia no tiene que mantenerse exactamente, sino que es suficiente cuando la distancia de repetición de la totalidad de los patrones a lo largo de la dirección de disposición de los patrones únicamente no se excede durante la producción de la micromatriz de antígeno. Por ejemplo, la superficie de sustrato también se puede separar o fragmentar después de tal distancia a lo largo de la dirección de disposición, que es mayor que la distancia de repetición de la totalidad de los patrones en la dirección de disposición, dentro de la cual todos los patrones diferentes están contenidos al menos una vez. Es suficiente cuando la distancia entre dos sitios de fragmentación es mayor que la distancia de repetición de la totalidad de los patrones y asimismo también menor que el doble de la distancia de repetición de la totalidad de los patrones. La separación o fragmentación tiene lugar en este sentido en particular en una dirección perpendicular a la dirección de disposición de los patrones.

La micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención y el procedimiento de acuerdo con la invención son asimismo ventajosos, dado que una ligera alineación errónea de manchas individuales dentro de un patrón determinado es un efecto al que el procedimiento de acuerdo con la invención reacciona de forma menos sensible que la solución según el estado de la técnica, en la que todas las manchas tienen que encajar en un patrón rígido y claramente definido con distancias iguales entre todas las manchas adyacentes. En el caso de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención, es precisamente posible que, con la disposición de los patrones sucesivamente uno sobre otro a lo largo de una dirección de disposición sobre la superficie de sustrato, también se puede configurar de manera diferente una separación de los patrones entre sí entre diferentes patrones. Si los patrones en el procedimiento de acuerdo con la invención se reconocen o detectan, por ejemplo, porque la regularidad de un patrón consiste en que las manchas de una cantidad de manchas correspondiente o de un patrón de manchas en cuestión están separados en de media una distancia determinada, entonces un patrón adyacente siguiente puede presentar una distancia de proximidad al patrón anterior, que puede ser diferente con respecto a otra distancia de proximidad entre otros patrones. No obstante, el procedimiento de acuerdo con la invención puede identificar todavía de manera robusta posiciones correspondientes de los patrones mediante un análisis de imagen de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención y asignar las manchas respectivas a tipos de antígeno respectivos.

Con respecto al patrón de referencia así como los patrones de antígeno, también se puede decir que la regularidad del patrón de referencia se diferencia de la regularidad de los patrones de manchas de antígeno porque los patrones, es decir, el patrón de referencia, así como también el patrón de manchas de antígeno, tienen un parámetro de regularidad común, cuyo valor se diferencia en el patrón de referencia de los valores de este parámetro de regularidad de los patrones de manchas de antígeno.

Preferentemente el mismo colorante común es un colorante fluorescente que también puede denominarse primer colorante fluorescente. Como alternativa, el mismo colorante común es un sustrato cromógeno que puede experimentar una unión con una enzima con el propósito de decoloración cromógena, que a su vez está contenido en un conjugado, mediante el cual se pueden incubar las manchas de la micromatriz de antígeno.

Preferentemente, el segundo colorante es un colorante fluorescente que puede denominarse segundo colorante fluorescente.

En una etapa de procedimiento, los colorantes fluorescentes respectivos se pueden excitar mediante irradiación de luz de excitación de diferentes longitudes de onda de excitación respectivas o una longitud de onda de excitación igual para la emisión de radiación fluorescente respectiva de diferentes longitudes de onda de fluorescencia respectivas. En este sentido, las longitudes de onda de luz de excitación para los dos colorantes fluorescentes pueden solaparse o también ser idénticas.

Preferentemente, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque el mismo colorante común es un colorante fluorescente.

Preferentemente, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque el segundo colorante común es un colorante fluorescente.

De acuerdo con una forma de realización, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque el patrón de referencia se diferencia de los patrones de manchas de antígeno en cuanto a su regularidad por uno o varios de los siguientes criterios:

- 5 a) dentro del patrón de referencia y dentro del patrón de manchas de antígeno, las manchas asociadas en cada caso se suceden a intervalos regulares, diferenciándose la distancia regular de las manchas de referencia del patrón de referencia de las distancias regulares de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno; la distancia regular es en este sentido el parámetro de regularidad de un patrón;
- 10 b) el patrón de referencia presenta, con respecto a un patrón directamente adyacente, una distancia de proximidad que se diferencia de las otras distancias de proximidad de los patrones de manchas de antígeno; la distancia de proximidad a un patrón adyacente en la dirección de disposición de los patrones es en este sentido la de los parámetros de regularidad de un patrón;
- 15 c) dentro del patrón de referencia y dentro del patrón de manchas de antígeno, las manchas asociadas respectivas presentan un tamaño igual respectivo, de modo que el tamaño de las manchas de referencia del patrón de referencia se diferencia de los tamaños de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno; el mismo tamaño de las manchas de un patrón es el parámetro de regularidad de un patrón.

De acuerdo con una forma de realización, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque las manchas de referencia de la cantidad de manchas de referencia forman un patrón de línea de referencia y porque las manchas de antígeno respectivas de las cantidades de manchas de antígeno respectivas forman asimismo patrones de línea de antígeno respectivos.

- 20 De acuerdo con una forma de realización, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque el patrón de línea de referencia se diferencia de los patrones de línea de antígeno en cuanto a su regularidad por uno o varios de los siguientes criterios:

- 25 a) dentro del patrón de línea de referencia y dentro del patrón de línea de antígeno, las manchas asociadas en cada caso se suceden a intervalos regulares, diferenciándose la distancia regular de las manchas de referencia del patrón de línea de referencia de las distancias regulares de las manchas de antígeno de los patrones de línea de antígeno;
- b) el patrón de línea de referencia presenta, con respecto a un patrón de línea directamente adyacente, una distancia de proximidad que se diferencia de las otras distancias de proximidad de los primeros patrones de línea;
- 30 c) dentro del patrón de línea de referencia y dentro del patrón de línea de antígeno, las manchas asociadas respectivas presentan un tamaño igual respectivo, de modo que el tamaño de las manchas de referencia del patrón de línea de referencia se diferencia de los tamaños de las manchas de antígeno del patrón de línea de antígeno;

- 35 Preferentemente, la distancia de las manchas de antígeno entre sí dentro de un patrón para al menos uno de los patrones se diferencia de una distancia de separación o distancia de proximidad del patrón a un patrón adyacente en la dirección de disposición de los patrones.

Preferentemente, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque las manchas de referencia presentan asimismo un antígeno.

- 40 Preferentemente, la micromatriz de antígeno se caracteriza porque las manchas de referencia presentan asimismo un anticuerpo, en particular IgG.

En el transcurso del procedimiento de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida tiene lugar preferentemente una emisión de las dimensiones de unión, en particular en forma de elemento de datos, que se emite en particular a través de una interfaz de datos.

- 45 Se propone asimismo un procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida, que presenta las etapas

- proporcionar o adquirir una primera información de imagen, que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización propuestas en este caso por un primer colorante,
- 50 - detectar el patrón de referencia así como una posición de referencia asociada basada en la al menos una primera información de imagen,
- detectar los patrones de manchas de antígeno respectivos, así como posiciones adicionales asociadas respectivas basándose en la al menos una primera información de imagen,

- basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, adquirir una información de asignación, que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos,
- 5 - proporcionar o adquirir una segunda información de imagen, que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización propuestas en este caso por un segundo colorante después de la incubación de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante,
- 10 - basándose en la segunda información de imagen, determinar dimensiones de unión respectivas, que indican uniones o grados de unión respectivos de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.

En el transcurso del procedimiento para el procesamiento de imágenes automatizado para la detección de anticuerpos de una muestra biológica líquida, preferentemente la primera información de imagen se recibe a través de al menos una interfaz de datos y se proporciona por medio de al menos una unidad de memoria, y la segunda información de imagen se recibe asimismo preferentemente a través de la interfaz de datos y se proporciona por medio de la unidad de memoria.

En el caso de que la micromatriz de antígeno presente las manchas de referencia primeras y segundas mencionadas anteriormente para formar el primer patrón de referencia regular y el segundo patrón de referencia regular, tienen lugar preferentemente en el procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida así como en el procedimiento para el procesamiento de imágenes automatizado para la detección de anticuerpos en una muestra biológica líquida, etapas adicionales. Estas etapas adicionales, que se van a llevar a cabo preferentemente son:

- detectar el segundo patrón de referencia así como una segunda posición de referencia asociada basada en la primera información de imagen,
- 25 - adquirir la información de asignación, que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos, basándose en la primera posición de referencia detectada, la segunda posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas.

En el transcurso del procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos así como del procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado tiene lugar la asignación de los patrones de manchas de antígeno detectados respectivos a tipos de antígeno respectivos por medio de etapas adicionales que van a llevarse a cabo preferentemente:

- determinar una sucesión espacial de la posición de referencia y de las posiciones adicionales
- proporcionar un conjunto de datos de sucesión, que indica una sucesión de tipos de antígeno,
- adquirir la información de asignación, que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos, basándose en la posición de referencia detectada, las posiciones adicionales detectadas y el conjunto de datos de sucesión.

Preferentemente, en uno o ambos de los procedimientos mencionados anteriormente tienen lugar etapas adicionales:

- reconocer varios patrones potenciales basándose en la al menos una primera información de imagen,
- 40 - detectar distancias de manchas respectivas entre manchas dentro de los patrones potenciales reconocidos respectivos o para los patrones potenciales reconocidos respectivos,
- seleccionar uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia basándose en las distancias de manchas detectadas, preferentemente por medio de una distancia de manchas máxima o una mínima.

Preferentemente, los patrones de las manchas sobre la micromatriz de antígeno están diseñados de tal manera se da una diferencia del patrón de referencia con respecto a los patrones de manchas de antígeno porque el patrón de referencia, con respecto a un patrón directamente adyacente, en particular a lo largo de una dirección de disposición de los patrones, presenta una distancia de proximidad tal que también se puede denominar distancia de patrón, que se diferencia de las otras distancias de proximidad o distancias de patrón de los patrones de manchas de antígeno. Entonces, preferentemente, en el transcurso de uno o de los dos procedimientos mencionados anteriormente, tienen lugar etapas llevadas a cabo preferentemente adicionales:

- 50 - reconocer varios patrones basándose en la al menos una primera información de imagen,
- detectar distancias de proximidad respectivas de los patrones reconocidos, en particular a lo largo de una dirección de disposición de los patrones, a sus patrones adyacentes, en particular directa o inmediatamente,

siguientes en cada caso,

- seleccionar uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia basándose en las distancias de proximidad detectadas.

5 En el caso de que la micromatriz de antígeno esté diseñada de tal manera que las manchas dentro del patrón de referencia y también dentro del patrón de manchas de antígeno se sucedan a distancias regulares, preferentemente equidistantes, diferenciándose la distancia regular de las manchas de referencia del patrón de referencia de las distancias regulares de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno, se pueden llevar a cabo preferentemente etapas adicionales en el transcurso de uno o ambos de los procedimientos mencionados:

- reconocer varios patrones basándose en la al menos una primera información de imagen,
- 10 - detectar tamaños de mancha respectivos para el patrón reconocido respectivo,
- seleccionar uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia basándose en los tamaños de manchas detectados.

En el caso de que el primer colorante sea un colorante fluorescente, en uno o ambos de los procedimientos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo preferentemente etapas adicionales:

- 15 - iluminar la micromatriz de antígeno con primera luz de excitación de un primer intervalo de longitud de onda para excitar una emisión de la primera radiación fluorescente por el primer colorante,

En este sentido, la primera información de imagen representa preferentemente una coloración de las manchas de referencia y las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por la primera radiación fluorescente.

20 En el caso de que el segundo colorante sea un colorante fluorescente, en uno o ambos de los procedimientos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo preferentemente etapas adicionales:

- iluminar la micromatriz de antígeno con una segunda luz de excitación de un segundo intervalo de longitud de onda para excitar una emisión de segunda radiación fluorescente por el segundo colorante.

En este sentido, la segunda información de imagen representa preferentemente una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por la primera radiación fluorescente.

25 Preferentemente, la primera luz de excitación y la segunda luz de excitación presentan la misma longitud de onda de excitación.

30 Se propone asimismo un dispositivo para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra que presenta al menos una unidad de adquisición de imágenes. La unidad de adquisición de imágenes está diseñada para adquirir una primera información de imagen que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización descritas este caso por un primer colorante. La unidad de adquisición de imágenes está diseñada asimismo para adquirir una segunda información de imagen que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización descritas en este caso por un segundo colorante después de la incubación de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante. El dispositivo presenta asimismo al menos una unidad de cálculo que está diseñada para

- basándose en la al menos una primera información de imagen, detectar el patrón de referencia así como una posición de referencia asociada,
- 40 - basándose en la al menos una primera información de imagen, detectar los patrones de manchas de antígeno respectivos así como posiciones adicionales asociadas respectivas,
- basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, crear una información de asignación, que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos,
- 45 - así como, basándose en la segunda información de imagen, determinar dimensiones de unión respectivas que indican uniones o grados de unión respectivos de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.

El dispositivo presenta asimismo al menos una unidad de iluminación para emitir luz de excitación para excitar una emisión de primera radiación fluorescente de un primer intervalo de longitud de onda por los primeros colorantes.

50 El dispositivo presenta asimismo al menos una unidad de iluminación para emitir luz de excitación para excitar una emisión de segunda radiación fluorescente de un segundo intervalo de longitud de onda por el segundo colorante.

El dispositivo propuesto para la detección automatizada de anticuerpos de una muestra presenta preferentemente al menos una unidad de cálculo, que asimismo está diseñada para llevar a cabo preferentemente otras etapas que se han divulgado o descrito anteriormente con referencia al procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos y/o al procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado.

5 Preferentemente, el dispositivo para la detección automatizada presenta una interfaz de datos a través de la cual, por medio de un elemento de datos o varios elementos de datos, se pueden proporcionar una información o diferentes informaciones. En este sentido puede tratarse de una o varias de las siguientes informaciones:

- una información con respecto a las dimensiones de unión respectivas mencionadas anteriormente,
- una información con respecto a posiciones de patrones detectados,

10 - una información con respecto a posiciones de manchas individuales,

- una información con respecto a una asignación de tipos de antígeno a cantidades de manchas de antígenos o patrones de manchas de antígeno.

Se propone asimismo un dispositivo de red de datos para la evaluación de imágenes automatizada para la detección de anticuerpos en una muestra. El dispositivo de red de datos es preferentemente un denominado sistema de nube.
 15 El dispositivo de red de datos presenta al menos una interfaz de datos que está diseñada para recibir una primera información de imagen, que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización propuestas en este caso por un primer colorante. La interfaz de datos está diseñada asimismo para recibir una segunda información de imagen que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno de
 20 acuerdo con la invención según una de las formas de realización propuestas en este caso por un segundo colorante después de la incubación de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante.

El dispositivo de red de datos presenta asimismo al menos una unidad de cálculo que está diseñada para

- 25 - basándose en la al menos una primera información de imagen, detectar el patrón de referencia así como una posición de referencia asociada,
- basándose en la al menos una primera información de imagen, detectar los patrones de manchas de antígeno respectivos así como posiciones adicionales asociadas respectivas,
- basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, crear una información de asignación, que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de
 30 antígeno respectivos,
- así como, basándose en la segunda información de imagen, determinar dimensiones de unión respectivas que indican uniones o grados de unión respectivos de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.

35 Se propone asimismo un producto de programa informático que comprende comandos que con la ejecución del programa por un ordenador hacen que este realice el procedimiento propuesto para un procesamiento de imágenes automatizado de acuerdo con una de las formas de realización propuestas en este caso.

Se propone asimismo una señal portadora de datos que transmite el producto de programa informático. La señal portadora de datos puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de paquetes de datos, en particular paquetes de IP. En particular, la señal de datos es una señal de datos de descarga para la transmisión de un software, en particular
 40 de una aplicación de software.

Se propone asimismo un portaobjetos que presenta múltiples micromatrices de antígeno de acuerdo con la invención según una de las forma de realización descritas en este caso.

Se propone asimismo un procedimiento para la producción de una micromatriz de antígeno para inmunodiagnóstico, que comprende las etapas

- 45 - proporcionar un sustrato con una superficie de sustrato plana,
- aplicar manchas de referencia sobre la superficie de sustrato plana, así como
- aplicar manchas de antígeno sobre la superficie de sustrato plana,

llevándose a cabo la aplicación de las manchas de antígeno de tal manera que las manchas de referencia y las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno están realizadas de acuerdo con una micromatriz de antígeno
 50 de acuerdo con la invención según una de las formas de realización descritas en este caso.

El procedimiento de producción presenta preferentemente asimismo la etapa de fragmentar el sustrato, para obtener varias micromatrices de antígeno, en particular en dos sitios de fragmentación, cuya distancia entre sí es mayor que una anchura del sustrato, dentro de la cual está presente la totalidad de patrones de referencia y patrones de antígeno.

- 5 Preferentemente, la superficie de sustrato es una superficie de un sustrato de vidrio o de un sustrato de vidrio revestido con una membrana y/o lámina.

La aplicación de las manchas de antígeno puede llevarse a cabo por medio de un aparato de microdosificación piezoeléctrico, y la superficie de sustrato puede ser en particular una superficie de un sustrato de vidrio o de un sustrato de vidrio revestido con una membrana y/o lámina. Con ello la producción puede llevarse a cabo con materiales básicos y máquinas de producción convencionales.

10 Se propone asimismo un kit para su uso en un procedimiento para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida que presenta una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención según una de las formas de realización descritas en este caso así como asimismo un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante. Preferentemente, el segundo colorante es un colorante fluorescente un sustrato cromógeno, una enzima o un sustrato para una reacción quimioluminiscente.

15 La micromatriz puede verse como un sustrato sólido, por ejemplo, una placa de vidrio o una placa de silicio, por ejemplo. La micromatriz también puede estar fabricada de plástico o de metal. La micromatriz puede ser translúcida o no translúcida, para favorecer la iluminación o detección de luz transmitida o luz incidente. La micromatriz de antígeno se puede utilizar en un sistema de escáner o sistema de cámara, en particular microscopio de fluorescencia, para examinar una muestra y se puede irradiar entonces con luz de iluminación o luz de excitación.

20 De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, la superficie de sustrato está microestructurada para enfocar. La microestructuración se puede realizar mediante un tratamiento de superficie (por ejemplo, rugosidad) y puede facilitar un enfoque sobre la superficie de sustrato. Distintos procedimientos de microestructuración, tal como por ejemplo moldeo por inyección, gofrado en caliente o procedimiento de impresión, se conocen por el estado de la técnica. Se pueden aplicar distintos marcadores de microestructura sobre la superficie, que también pueden usarse para la identificación de la micromatriz de antígeno, para la identificación de la muestra, etc. El sustrato de antígeno (la micromatriz) comprende en particular una superficie con un tamaño entre 1 mm x 1 mm y 2 mm x 4 mm.

25 El término "quimioluminiscencia", tal como se usa en este caso, se refiere a una reacción química en la que se dirige energía específicamente a una molécula, lo que provoca que se excite electrónicamente y a continuación libere un fotón, mediante lo cual se emite luz visible. No se necesita energía térmica para esta reacción. Por lo tanto, la quimioluminiscencia incluye la conversión directa de energía química en energía luminosa. Preferentemente, se genera quimioluminiscencia mediante la reacción de un luminóforo con otros compuestos. Estas reacciones pueden ser catalizadas por enzimas. En formas de realización preferentes adicionales de la invención, el luminóforo se selecciona del grupo que consiste en luminol y derivados del mismo, acridina y derivados de la misma y luciferinas. Estos compuestos pueden excitarse mediante distintas reacciones enzimáticas dando quimioluminiscencia. Los correspondientes compuestos y reacciones son conocidos en el estado de la técnica. En formas de realización preferidas adicionales de la invención, el luminóforo es luminol o un derivado del mismo, emitiéndose luz (quimioluminiscencia) por una reacción catalizada por peroxidasa, en particular peroxidasa del rábano picante. En formas de realización alternativas de la invención, el luminóforo es acridina o un derivado de la misma, en particular un éster de acridinio o acridinosulfonamida, emitiéndose luz (quimioluminiscencia) por una reacción catalizada por fosfatasa, en particular fosfatasa alcalina (AP). En otras formas de realización alternativas de la invención, el luminóforo es una luciferina, en particular D-luciferina, emitiéndose luz (quimioluminiscencia) por una reacción catalizada por luciferasa.

30 Un "sustrato cromógeno", en el sentido de la presente invención, es un reactivo que se puede utilizar para medir actividades enzimáticas. El sustrato cromógeno se modifica mediante actividad enzimática de modo que se puede cuantificar (fotométricamente) un producto directo o indirecto de la reacción enzimática. El sustrato cromógeno se compone, por ejemplo, de un oligopéptido, al que está acoplado un colorante azoico, por ejemplo, paranitroanilina. El péptido imita la interfaz en la que la enzima que se va a examinar escinde su sustrato fisiológico. Mediante la acción enzimática se libera el colorante. El desarrollo de color se puede cuantificar fotométricamente y la actividad enzimática se puede determinar a través de una curva de calibración. No obstante, el sustrato cromógeno también puede ser 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato (BCIP) y/o cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT). Un sustrato cromógeno se puede detectar, por ejemplo, por colorimetría.

35 Los antígenos que están contenidos en las distintas manchas de antígeno, se pueden seleccionar y diseñar para unirse a anticuerpos que se forman como consecuencia de enfermedades autoinmunitarias, alergias y enfermedades infecciosas. En el presente sistema de prueba, esto se refiere en particular a anticuerpos antinucleares y/o antinucleares extraíbles de la zona de las colagenosis. En particular, pueden estar contenidos, por ejemplo, los siguientes antígenos (solos o en cualquier combinación) en las manchas de antígeno: RNP/Sm, Sm, Scl-70, Rib.P0, Jo-1, SS-A, SS-B, ADNbc, nucleosomas/cromatina, Cenp-B, RNP A,C,68kDa, Ro-52, Ku, histona, DFS70. Las

colagenosis diagnosticables pueden contener al menos una de las siguientes formas: LES (lupus eritematoso sistémico), PM, DM (miositis), SS (síndrome de Sjögren), síndrome de CREST (forma cutánea limitada de esclerosis sistémica lcSSc), PSS (esclerosis sistémica progresiva), MCTD (enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome agudo), AID (enfermedad autoinmunitaria inducida). Con ello se pueden diagnosticar distintas enfermedades.

- 5 Formas de realización ventajosas de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes y se explican con más detalle en la siguiente descripción con referencia parcial a las figuras.

A este respecto, muestran:

- las figuras 1 y 2 micromatrices de antígeno del estado de la técnica,
- 10 las figuras 3a y 3b formas de realización a modo de ejemplo de una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención,
- las figuras 4a y 4b una superficie de sustrato provista de manchas para la producción de una micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención, así como micromatrices de antígeno de acuerdo con la invención a modo de ejemplo,
- 15 las figuras 5a y 5b imágenes respectivas de una micromatriz de antígeno a modo de ejemplo en canales de color respectivos debido a la coloración respectiva por colorantes respectivos,
- la figura 6 un espectro a modo de ejemplo de una luz de excitación así como de una luz fluorescente,
- la figura 7 un ejemplo adicional de un espectro de una luz de excitación, así como espectros de luz fluorescente respectivos de colorantes fluorescentes respectivos,
- 20 la figura 8 una forma de realización preferida de un dispositivo de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra,
- la figura 9 una forma de realización preferida de un dispositivo de red de datos de acuerdo con la invención,
- la figura 10 etapas preferidas para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos de una muestra biológica líquida de acuerdo con una forma de realización preferida,
- 25 la figura 11a etapas preferidas en el transcurso de una detección de un segundo patrón de referencia,
- la figura 11b etapas preferidas en el transcurso de una creación de una información de asignación,
- la figura 11c una forma de realización a modo de ejemplo de un conjunto de datos de sucesión,
- la figura 12 una forma de realización de un conjunto de datos para indexar dimensiones de unión,
- 30 la figura 13 etapas preferidas para la realización en el transcurso de un procedimiento para la producción de una micromatriz de antígeno,
- la figura 14 etapas preferidas para la realización para la detección de un patrón de referencia así como patrones de manchas de antígeno respectivos,
- La figura 15 etapas preferidas para llevar a cabo en el transcurso de un reconocimiento de varios patrones potenciales basándose en una primera información de imagen, así como una detección de distancias de manchas respectivas de manchas de patrones,
- 35 la figura 16 un uso de información de posición en el transcurso de una determinación de dimensiones de unión basándose en una segunda información de imagen;
- la figura 17 etapas preferidas para la realización en el transcurso del procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos o del procedimiento para el procesamiento de imágenes automatizado para la detección de anticuerpos,
- 40 la figura 18 una forma de realización preferida de un portaobjetos de acuerdo con la invención con una pluralidad de micromatrices de antígeno,
- la figura 19 una representación detallada de un campo con varias micromatrices de antígeno,
- 45 la figura 20a una primera información de imagen o una primera imagen que representa una coloración de manchas de referencia y manchas de antígeno en un primer canal de color,
- la figura 20b la primera información de imagen o la primera imagen, tal como se muestra en la figura 20a, junto

con información de posición indexada de manchas,

la figura 21a una segunda información de imagen o una segunda imagen que indica una coloración de manchas de referencia y manchas de antígeno en un segundo canal de color,

5 la figura 21b la segunda información de imagen o la segunda imagen, tal como se muestra en la figura 21a, junto con posiciones indexadas de manchas, tal como se obtiene del primer canal de color o de la primera información de imagen,

la figura 22a una forma de realización a modo de ejemplo de una micromatriz de antígeno, en la que el patrón de referencia presenta una distancia de proximidad diferente a un patrón de proximidad siguiente que los patrones de manchas de antígeno,

10 la figura 22b muestra una forma de realización a modo de ejemplo de una micromatriz de antígeno, en la que el patrón de referencia presenta manchas de referencia con un tamaño igual, que se diferencia de los tamaños de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno.

15 Tal como ya se ha expuesto anteriormente, se conoce por el estado de la técnica, disponer micromatrices de antígeno con manchas de diferentes tipos de antígeno en una especie de patrón de tablero de ajedrez. Tal como se explicó anteriormente, en este sentido, en el transcurso de una producción de una micromatriz de antígeno puede ocurrir que una micromatriz de antígeno AC, tal como se muestra en la figura 2, presente una orientación de manchas de antígeno AS, que no coincide con una cuadrícula que se aplicará más tarde, que se usa para asignar las manchas AS, debido a su posición precisa, a tipos de antígeno correspondientes, de modo que puede tener lugar una detección de una unión de anticuerpos de una muestra líquida a determinados tipos de antígeno mediante evaluación en un denominado segundo canal de color.

20 La figura 3a muestra una forma de realización a modo de ejemplo de una micromatriz de antígeno A, en la que sobre una superficie de sustrato SO se han aplicado manchas de antígeno AS en patrones de manchas de antígeno AM a una distancia entre sí, presentando las manchas de antígeno AS un colorante igual común o primer colorante.

25 Las manchas de antígeno forman cantidades de manchas de antígeno AG respectivas, que a su vez forman patrones de manchas de antígeno regulares AM respectivos. En este ejemplo de realización, estos son patrones AM, en los que manchas de antígeno están dispuestas a lo largo de una línea que discurre de arriba abajo.

La micromatriz de antígeno A presenta asimismo un patrón de referencia RM con manchas de referencia, que presentan una distancia de manchas SD1 entre sí.

30 La distancia de manchas SD2 de las manchas de antígeno del patrón de manchas de antígeno AM es diferente de la distancia de manchas SD1 del patrón de referencia RM.

35 El parámetro de regularidad de los patrones RM, AM es en este sentido la distancia de manchas SD1 respectiva, SD2 dentro de los patrones RM o AM respectivos. Es decir, el patrón de referencia RM se diferencia de los patrones de manchas de antígeno AM en cuanto al valor de este parámetro de regularidad o en cuanto a su regularidad. Los patrones RM, AM están dispuestos a lo largo de una dirección de disposición ANR. Los patrones RM, AM presentan en cada caso una dirección de propagación ABR, que es perpendicular a la dirección de disposición ANR de los patrones AM, RM.

Las manchas de los patrones RM, AM presentan un colorante igual común.

Se supone que las manchas de antígeno del patrón de manchas de antígeno AM1 presentan un antígeno común igual o un antígeno común igual que se diferencian de un tipo de antígeno o un antígeno del patrón AM2.

40 Si una micromatriz de antígeno A de este tipo se incubaba con todas sus manchas de los patrones RM, AM con una muestra biológica tal como un suero sanguíneo, entonces para las manchas de los diferentes patrones de manchas de antígeno AM1, AM2, debido a los diferentes tipos de antígeno de los patrones AM1, AM2, pueden producirse uniones de intensidad diferente de anticuerpos de la muestra líquida biológica a tipos de antígeno respectivos.

45 Si una unión de este tipo un denominado primer anticuerpo de la muestra líquida biológica, entonces se detectará posteriormente.

50 Preferentemente, la micromatriz de antígeno A presenta otro segundo patrón de referencia RM2, que se diferencia con sus manchas de referencia en cuanto a su regularidad o su valor del parámetro de regularidad tanto del primer patrón de referencia RM como del patrón de manchas de antígeno AM. Este es el caso, dado que el patrón de referencia RM2 presenta una distancia de manchas SD3, que se diferencia claramente de las distancias de manchas SD1, SD2.

El colorante común igual de las manchas de los patrones RM, RM2, AM es preferentemente visible en un primer canal de color como canal rojo.

La regularidad del patrón de referencia RM se diferencia de los patrones de manchas de antígeno AM y en particular también del segundo patrón de referencia RM2 por una variación de un parámetro de regularidad común de los patrones RM, AM y en particular RM2. En el sentido de esta solicitud, una regularidad también puede denominarse una periodicidad de un patrón, siendo el parámetro de regularidad un parámetro de periodicidad. Patrones de manchas que se diferencian presentan entonces valores diferentes en cuanto a un parámetro de regularidad igual de los patrones de manchas.

Las figuras 5a y 5b muestran una primera información de imagen BI1 o una segunda información de imagen BI2 con coloraciones respectivas en diferentes canales de color mediante colorantes respectivos.

La primera información de imagen BI1 muestra un patrón de referencia RM a modo de ejemplo así como un segundo patrón de referencia RM2 a modo de ejemplo y preferentemente presente en el primer canal de color debido a una coloración del primer colorante. Asimismo, patrones de manchas de antígeno AM son visibles en la primera información de imagen BI1 debido a la coloración por el primer colorante en el primer canal de color.

La previsión o el uso de un segundo patrón de referencia RM2 propuesto hace posible que, en el transcurso de una evaluación de imagen automatizada, pueda corregirse entonces una sucesión supuesta de tipos de antígeno en la dirección de disposición ANR basándose en el patrón de manchas de antígeno individual AM cuando la micromatriz de antígeno A mostrada en la figura 3a se ha rotado 180°. Mediante la posición del primer patrón de referencia RM y del segundo patrón de referencia RM2 entre sí, puede detectarse entonces una rotación no deseada de este tipo de la micromatriz de antígeno A en una información de imagen del primer canal de color y, así corregirse la ubicación o la posición de los patrones de manchas de antígeno a lo largo dirección de disposición asumida ANR incluso en el caso de una rotación no deseada de 180° de la micromatriz de antígeno.

El primer colorante es preferentemente un colorante fluorescente. Como alternativa, el primer colorante es un sustrato cromógeno que puede experimentar una unión con una enzima con el propósito de coloración cromógena, que se puede agregar mediante otro conjugado en el transcurso de una incubación adicional de una micromatriz de antígeno. La decoloración debida a una unión del sustrato cromógeno con una enzima puede considerarse como un producto de decoloración que se puede detectar fotométricamente.

La segunda información de imagen BI2 de la figura 5b muestra que no para todos los patrones de manchas de antígeno AM está presente significativamente una coloración en el segundo canal de color debido al segundo colorante. Este es presumiblemente el caso, dado no tuvo lugar una unión esencial o significativa de anticuerpos de la muestra biológica líquida a los tipos de antígeno correspondientes de los patrones de manchas de antígeno correspondientes, de modo con una incubación de la micromatriz de antígeno con un segundo conjugado, que contiene un segundo anticuerpo con un marcaje por el segundo colorante, entonces, los segundos anticuerpos no se unieron a primeros anticuerpos de la muestra biológica líquida.

El segundo colorante es preferentemente un colorante fluorescente.

Preferentemente, el segundo colorante fluorescente es un sustrato cromógeno que puede experimentar una unión a una enzima, pudiendo estar contenida la enzima en un conjugado que se puede usar para incubar las manchas en una etapa de procesamiento adicional. La enzima experimenta entonces con el sustrato cromógeno un producto de decoloración que se puede detectar fotométricamente.

Preferentemente, el segundo colorante es una enzima de modo que con una incubación de las manchas con un conjugado, que presenta un sustrato cromógeno, la enzima experimenta una unión con el sustrato cromógeno para generar un producto de decoloración, que se puede detectar fotométricamente.

Preferentemente, el segundo colorante es una enzima que en el transcurso de una etapa de procesamiento adicional mediante incubación de las manchas con un conjugado, que presenta un sustrato adicional, puede experimentar una unión o interacción, de modo que se emite radiación debido a una reacción quimioluminiscente.

Preferentemente, el segundo colorante es un sustrato para una reacción quimioluminiscente, de modo que con la incubación de las manchas con un conjugado, que presenta una enzima que a su vez puede experimentar una reacción con el sustrato, se provoca la reacción quimioluminiscente, de modo que se emite radiación quimioluminiscente.

En el caso de que un colorante sea un colorante fluorescente, puede excitarse por ejemplo una radiación fluorescente FL mediante una luz de excitación AL1 o AL2, tal como se muestra en la figura 6. La luz fluorescente FL es preferentemente la luz que se emite por el primer colorante fluorescente. Los ejes en la representación de la figura 6 muestran en la abscisa la longitud de onda WL así como la intensidad IN en la ordenada.

Los ejes en la representación de la figura 7 muestran en la abscisa la longitud de onda WL así como la intensidad IN en la ordenada. La figura 7 muestra en un diagrama con una longitud de onda WL en la abscisa así como una intensidad IN en la ordenada un espectro de una luz de excitación AL, un espectro FL1 de una primera radiación fluorescente por un primer colorante fluorescente así como un espectro FL2 de una segunda radiación fluorescente por un segundo colorante fluorescente.

La primera fluorescencia FL1 puede comprender emisión de luz en un primer intervalo de longitud de onda y la segunda fluorescencia FL2 puede comprender emisión de luz en un segundo intervalo de longitud de onda, presentando el primer intervalo de longitud de onda y el segundo intervalo de longitud de onda solo un intervalo de superposición pequeño o esencialmente nulo, por ejemplo, un intervalo de superposición o una superposición, que corresponde, por ejemplo, a menos del 10 %, en particular menos del 5 %, de una integral de una emisión de la primera fluorescencia a lo largo de la longitud de onda.

El primer colorante fluorescente puede, por ejemplo, fluorescer por ejemplo en un intervalo de longitud de onda rojo, por ejemplo en un intervalo entre 550 nm y aproximadamente 800 nm con un máximo entre 600 nm y 660 nm. Para ello, por ejemplo, el primer colorante fluorescente puede ser el colorante DY521XL. La excitación del primer colorante fluorescente puede tener lugar en un intervalo de frecuencia por ejemplo entre 450 nm y 500 nm, con un máximo por ejemplo entre 550 nm y 580 nm. La excitación del segundo colorante fluorescente puede tener lugar esencialmente en el mismo intervalo de longitud de onda que la excitación del primer colorante fluorescente. El segundo colorante fluorescente puede, por ejemplo, fluorescer por ejemplo en un intervalo de longitud de onda verde, por ejemplo en un intervalo entre 500 nm y aproximadamente 600 nm con un máximo entre 510 nm y 530 nm. Para ello, por ejemplo, el primer colorante fluorescente puede ser el colorante FITC.

Con ello, en un dispositivo para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra, por ejemplo, solo se requiere una única fuente de luz de iluminación para generar la luz de excitación que puede estar realizada con banda relativamente estrecha. Con ello, la luz de excitación se puede filtrar ventajosamente antes de que la primera fluorescencia sea detectada por una primera cámara y la segunda fluorescencia por una segunda cámara o ambas señales de fluorescencia sean detectadas por la primera o la segunda cámara (por ejemplo, después de un cambio de filtro), sin detectar esencialmente luz de excitación perturbadora.

Volviendo a la figura 5a, se puede observar que las manchas de referencia de la cantidad de manchas de referencia RM pueden presentar preferentemente el colorante en una concentración de colorante que es mayor que las concentraciones de colorante en las que las manchas de antígeno o las cantidades de manchas de antígeno o patrón de manchas de antígeno AM y, en particular también el patrón de referencia RM2 presentan el primer colorante o el mismo colorante común. Preferentemente, el segundo patrón de referencia RM2 puede presentar también el mismo tienen colorante común en una concentración de colorante que es mayor que las concentraciones de colorante en las que las manchas de antígeno de las cantidades de manchas de antígeno AM presentan el mismo colorante común.

Si las manchas de la cantidad de manchas de referencia RM, y en particular también de la segunda cantidad de manchas de referencia RM2 presentaran el mismo colorante común en una concentración de colorante mayor, entonces, de este modo, podría facilitarse una detección del patrón de referencia RM - y en particular también del patrón de referencia adicional RM2 - en el transcurso del procesamiento de imagen automatizado, dado que las intensidades de color de estas manchas en una información de imagen serían mayores que las de las manchas de antígeno de las cantidades de manchas de antígeno.

Volviendo a la figura 3a, se puede observar asimismo que el patrón de referencia RM forma un patrón de línea de referencia y que asimismo los patrones de manchas de antígeno AM forman igualmente patrones de línea de referencia, presentando las líneas de los patrones RM y AM una misma dirección de propagación. Igualmente el patrón de referencia RM2 forma un patrón de línea de referencia. Esto también puede denominarse patrón de línea de referencia adicional o segundo.

Dentro de los patrones de línea RM, RM2, AM, las manchas asociadas respectivas de este patrón se suceden esencialmente a distancias regulares, preferentemente distancias esencialmente equidistantes entre sí, diferenciándose la distancia regular, preferentemente distancia esencialmente equidistante de las manchas de referencia del patrón de línea de referencia RM de las distancias regulares, preferentemente distancias esencialmente equidistantes de las manchas de antígeno de los patrones de línea de antígeno AM. Si, además del patrón de referencia RM está presente un segundo patrón de referencia RM2 adicional como patrón de línea, entonces este patrón RM2 se diferencia tanto del primer patrón de referencia RM como de los patrones de línea de antígeno AM en que las manchas asociadas del patrón RM2 se diferencian por su distancia regular, preferentemente distancia esencialmente equidistante de las distancias regulares, preferentemente distancias esencialmente equidistantes de las manchas de antígeno de los patrones de línea de antígeno AM como también de las manchas del primer patrón de referencia RM2.

La figura 3b muestra una variante preferida A2 de una micromatriz de antígeno A2 de acuerdo con la invención, en la que solo tres patrones de manchas de antígeno AM1, AM2, AM3 están presentes en la micromatriz de antígeno A2. En este sentido se trata de un subconjunto de patrones que ya están presentes en esta disposición sobre la micromatriz de antígeno A de la figura 3a. También en este sentido los patrones RM, RM2, AM están dispuestos en una dirección de disposición ANR. Para ilustrar una de las ventajas del procedimiento de acuerdo con la invención y de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención se supone que se pretende producir una micromatriz de antígeno, tal como se muestra en la figura 3b.

La figura 4a muestra un sustrato o una superficie de sustrato SU. La superficie de sustrato SU es preferentemente

una superficie de un sustrato de vidrio o de un sustrato de vidrio revestido con una membrana y/o lámina. Sobre el sustrato SU se aplicarán diferentes patrones RM, RM2, AM a lo largo de una dirección de disposición ANR sobre el sustrato. Para ello, las manchas de los respectivos patrones RM, RM2, AM se aplican por medio de pipetas P respectivas sobre el sustrato SU. Las pipetas P pueden ser en este sentido estacionarias, de modo que a través de gotas T respectivas, las pipetas P aplican manchas respectivas para una cantidad de manchas respectiva, preferentemente como un patrón de línea sobre la superficie de sustrato SU, pudiendo desplazarse en una dirección de avance VR1 el sustrato SU con respecto a las pipetas P de modo que se forman los patrones regulares mencionados anteriormente. Es decir, las manchas de referencia de la cantidad de manchas de referencia RM forman un patrón de línea de referencia y las manchas de antígeno de las cantidades de manchas de antígeno AM respectivas forman patrones de línea de antígeno respectivos. Lo mismo se aplica al segundo patrón de referencia RM2 que preferentemente presente.

Si la superficie de sustrato SU se ha desplazado en la dirección de avance VR1 con respecto a las pipetas P hasta que se han formado los correspondientes patrones de línea RM, RM2, AM, entonces resulta una distancia DI1 que especifica en la dirección de disposición de los patrones ANR la anchura mínima de la micromatriz de antígeno que se va a producir. Si el soporte de sustrato SU se desplaza hacia atrás entonces en contra de la dirección de avance VR1 a la posición original representada en la figura 4a, entonces mediante un desplazamiento o deslizamiento del soporte de sustrato SU en la dirección de avance VR2 en la distancia DI1, puede formarse un nuevo conjunto de correspondientes patrones de referencia RM, RM2 y patrones de manchas de antígeno AM, avanzando entonces a su vez también el soporte de sustrato SU en la dirección de avance VR1 para provocar un movimiento relativo del soporte de sustrato SU con respecto a las pipetas P. Para formar los patrones de línea correspondientes RM, RM2, AM con diferentes distancias regulares de sus manchas respectivas, es decir, las pipetas P correspondientes solo tienen que controlarse de tal manera que las gotas T se formen con diferentes frecuencias o diferentes distancias a lo largo de la dirección de avance VR1. Una formación de los patrones RM, RM2, AM como patrones de línea permite una producción especialmente efectiva de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención. Es decir, se pueden generar sobre el soporte de sustrato SU entonces patrones para varias micromatrices de antígeno en el procesamiento en serie y no tiene que usarse un soporte de sustrato SU propio para cada micromatriz de antígeno. La aplicación mediante cabezales de pipeta tiene lugar en particular mediante una denominada presión por efecto piezoeléctrico por medio de un aparato de microdosificación piezoeléctrico como una forma de configuración especial de las pipetas P. Por lo tanto, se puede establecer que una aplicación de manchas de referencia y manchas de antígeno sobre la superficie de sustrato plana SU se realiza de manera que resulta una micromatriz de antígeno de acuerdo con la forma de realización descrita anteriormente.

La figura 4b ilustra ahora una ventaja particular de la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención. La superficie de sustrato de la figura 4a podría fragmentarse exactamente de manera que se fragmenta siempre exactamente según la distancia DI1 el sustrato SU en paralelo a la dirección de propagación de los patrones, es decir, en perpendicular a la dirección ANR de los patrones. Resultaría entonces una ubicación del patrón de referencia RM y de los patrones de manchas de antígeno AM sobre las distintas micromatrices de antígeno que se van a producir en un sitio o posición igual, que se repite, sobre la micromatriz de antígeno correspondiente. Debido a la configuración de acuerdo con la invención de los patrones de manchas de antígeno AM y del patrón de referencia RM como también en particular del segundo patrón de referencia RM2 se posibilita sin embargo, tal como se ilustra en la figura 4b, una fragmentación de este tipo en al menos uno, en particular en dos sitios, del sustrato SU a una distancia DI2 que solo se puede seleccionar aproximadamente, de modo que pueden resultar correspondientes micromatrices de antígeno A11 así como A12 de la figura 4b. Es esencial que la distancia DI2, tras la cual tiene lugar una fragmentación del soporte de sustrato SU, sea al menos tan grande como la distancia DI1 o también mayor que esta distancia DI1. La distancia DI2 que se va a seleccionar tiene que ser asimismo únicamente menor que el doble de la distancia DI1, para evitar una repetición completa de la totalidad de todos los patrones AM, RM, RM2. Si bien resulta entonces sobre la micromatriz de antígeno resultante A11 en la zona derecha una repetición del patrón de manchas de antígeno AM1, sin embargo, la sucesión de los tipos de antígeno correspondientes de los patrones de manchas de antígeno AM1, AM2, AM3 se puede usar, debido a la diferenciación de estos patrones con respecto a los patrones de referencia RM y en particular el patrón de referencia RM2 en el transcurso de una evaluación de imagen automatizada, para detectar, para al menos cada tipo de antígeno o cada uno de los patrones de manchas de antígeno AM1, AM2, AM3, una unión de anticuerpos. La micromatriz de antígeno A12 producida posteriormente presenta, mediante elección de la distancia de fragmentación DI2 en comparación con la distancia de repetición DI1 de los patrones de manchas de antígeno y del patrón de referencia como también, en particular, del segundo patrón de referencia entonces al menos cualquier tipo de un patrón de manchas de antígeno AM1, AM2, AM3 como también el patrón de referencia RM y en particular también el segundo patrón de referencia RM2 al menos una vez. Solo a través de la configuración de acuerdo con la invención de los patrones de manchas de antígeno y también del al menos un patrón de referencia RM resulta la posibilidad de tener que efectuar la fragmentación del sustrato SU no en posiciones fijas, tal como está predefinido por la distancia DI1, sino seleccionar esta distancia de sitios de fragmentación con mucha más libertad o de manera más imprecisa. En la solución según el estado de la técnica es necesario, tal como se explicó previamente con referencia a las figuras 2 y 1, que una mancha de antígeno ASX respectiva sobre un sustrato correspondiente o dentro de un patrón correspondiente aparezca en una posición precisa correspondiente, para poder efectuar correctamente una asignación de la mancha ASX a un tipo de antígeno determinado. Este requisito se evita de forma especialmente hábil mediante la micromatriz de antígeno de acuerdo con la invención así como el procedimiento propuesto para la detección automatizada de anticuerpos, así como el

procedimiento propuesto para un procesamiento de imágenes automatizado y conduce a un modo de producción particularmente sencillo de micromatrices de antígeno A11, A12.

Las manchas de referencia RM del patrón de referencia pueden presentar asimismo también preferentemente un antígeno, de modo que entonces una unión de anticuerpos de la muestra biológica, a la que pueden unirse, a su vez, segundos anticuerpos de un conjugado bajo marcaje con un segundo colorante, puede detectarse y por lo tanto puede usarse otro tipo de antígeno adicional en cuanto a una detección de anticuerpos en la muestra biológica.

Preferentemente, las manchas de referencia del patrón de referencia RM como también en particular del patrón de referencia RM2 presentan anticuerpos, en particular en forma de IgG anti-ser humano. Un anticuerpo de este tipo puede experimentar entonces una unión con un anticuerpo en una muestra de paciente líquida, por ejemplo un suero sanguíneo, de modo que después de una incubación adicional de las manchas de referencia con un conjugado, que a su vez puede presentar un segundo anticuerpo marcado con un segundo colorante, se da una unión del segundo colorante a las manchas de referencia. Con ello, se puede controlar entonces posteriormente en el transcurso de un procesamiento de imágenes automatizado como también un procedimiento para detectar anticuerpos, si la micromatriz de antígeno se incubó correctamente con la muestra y/o el conjugado. Es decir, las manchas de referencia RM, RM2 pueden usarse como un control de incubación.

La figura 13 muestra de nuevo etapas del procedimiento de producción propuesto. En la etapa S100 tiene lugar una provisión de un sustrato con una superficie de sustrato plana. En la etapa S101 tiene lugar una aplicación de manchas de referencia sobre la superficie de sustrato plana. En una etapa S102 tiene lugar una aplicación de manchas de antígeno sobre la superficie de sustrato plana. En este sentido, la aplicación de las manchas de antígeno y de las manchas de referencia para obtener una micromatriz de antígeno tiene lugar de acuerdo con una forma de realización de la manera descrita anteriormente. En una etapa S103 que va a efectuarse preferentemente tiene lugar una fragmentación del sustrato, para obtener varias micromatrices de antígeno. La fragmentación tiene lugar manteniendo una distancia entre dos sitios de fragmentación, que, en el caso de una sucesión repetitiva de patrones de manchas de antígeno y patrones de manchas de referencia, es al menos tan grande como una distancia que describe esta sucesión repetitiva en una dirección de disposición de los patrones.

Si se produjeran varias micromatrices de antígeno según la manera que se ha descrito anteriormente, entonces, se pueden proporcionar varias micromatrices de antígeno reunidas sobre un portaobjetos. Para ello, la figura 18 muestra un portaobjetos OT, que en diferentes campos FE presenta en cada caso varias micromatrices de antígeno A.

La figura 19 muestra una representación detallada de un único campo FE con varias micromatrices de antígeno A.

Tal como se representa en las figuras 3a, 3b, 4a así como 4b, los patrones de manchas de antígeno AM así como el patrón de referencia RM pueden diferenciarse porque presentan una periodicidad diferente respectiva o una distancia regular diferente de manchas de antígeno entre sí. Esta formación de los patrones de manchas de antígeno AM y del patrón de referencia RM se ilustra en este caso de esta manera solo a modo de ejemplo. Preferentemente, la diferencia del patrón de referencia RM, en particular también del segundo patrón de referencia RM2, con respecto a los patrones de manchas de antígeno AM, consiste en que el patrón de referencia RM a lo largo de la dirección de disposición ANR hasta un patrón inmediatamente adyacente siguiente presenta una distancia de proximidad directa tal que se diferencia de las distancias de proximidad de los patrones de manchas de antígeno AM. Es decir, en este sentido los patrones RM, AM no presentan distancias regulares diferentes de sus manchas respectivas dentro de los patrones RM, AM, sino que pueden diferenciarse debido a una distancia o una distancia de proximidad hacia el siguiente patrón en o a lo largo de la dirección de disposición ANR.

Asimismo es posible que el patrón de referencia RM, y en particular también el segundo patrón de referencia RM2, presente manchas de este tipo, que tienen un tamaño igual, diferenciándose el tamaño de las manchas del patrón de referencia RM de los tamaños de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno AM. Es decir, en este sentido, el patrón de referencia RM y el patrón de manchas de antígeno AM pueden diferenciarse en que, en cada caso, se forman manchas de diferentes tamaños para los diferentes patrones RM, AM respectivos, que en el transcurso de un procedimiento de producción, tal como se ilustra en la figura 4a, por ejemplo, mediante diferentes tamaños de pipeta se pueden usar para la generación de diferentes tamaños de manchas o diferentes tamaños de gotas para formar las manchas.

La figura 10 muestra etapas preferidas de un procedimiento de acuerdo con la invención para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida.

En una etapa S1 tiene lugar una provisión de una micromatriz de antígeno según una de las formas de realización descritas anteriormente. En una etapa S2 tiene lugar una incubación de las manchas de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica. En una etapa S3 tiene lugar una incubación de las manchas con un conjugado, que presenta un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante. En una etapa S4 tiene lugar una provisión o adquisición de una primera información de imagen BI1, BI11, que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por un primer colorante.

En el caso de que el primer colorante sea un colorante fluorescente, tiene lugar preferentemente en la etapa S4 una

iluminación de la micromatriz de antígeno con una primera luz de excitación de una primera longitud de onda para excitar una emisión de la primera radiación fluorescente por el primer colorante. La primera información de imagen representa entonces una coloración de las manchas de referencia y las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por la primera radiación fluorescente. Esto tiene lugar preferentemente en un denominado canal rojo.

- 5 En una etapa S5, tiene lugar una detección del patrón de referencia así como una posición de referencia asociada sobre la superficie de sustrato, asumiendo una dirección de disposición de los patrones sobre la superficie de sustrato basándose en la al menos una primera información de imagen. La posición de referencia se puede proporcionar como una información de posición de referencia RPI.

- 10 En una etapa S6, tiene lugar una detección de los patrones de manchas de antígeno respectivos así como de las posiciones adicionales asociadas respectivas sobre la superficie de sustrato, asumiendo una dirección de disposición de los patrones sobre la superficie de sustrato basándose en la al menos una primera información de imagen. Esta se puede proporcionar como una denominada información de posición global AGMPI con respecto a las posiciones adicionales de los patrones de manchas de antígeno.

- 15 En una etapa S7, entonces, basándose en la posición de referencia detectada así como las posiciones adicionales detectadas se crea una información de asignación ZI que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos.

- 20 En una etapa S8 tiene lugar entonces una adquisición o una provisión de una segunda información de imagen BI2, BI12, que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno y preferentemente también de las manchas de referencia por el segundo colorante. En el transcurso de esta etapa S8, en el caso de que el segundo colorante sea un colorante fluorescente, tiene lugar preferentemente una iluminación de la micromatriz de antígeno con una segunda luz de excitación de una segunda longitud de onda, para excitar una emisión de una segunda radiación fluorescente. Preferentemente, la segunda luz de excitación de la segunda longitud de onda es idéntica en su intervalo de longitud de onda al intervalo de longitud de onda de la primera luz de excitación para excitar la primera radiación fluorescente del primer colorante fluorescente. La segunda información de imagen representa entonces preferentemente una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por la segunda radiación fluorescente.

- 25 En una etapa S9, puede tener lugar entonces, preferentemente con el uso de la información de posición de referencia RPI así como de la información de posición adicional AGMPI, una determinación de dimensiones de unión respectivas, que son uniones o grados de unión respectivos de anticuerpos de la muestra biológica al medicamento de tipo de antígeno respectivo, basándose en la segunda información de imagen BI2, BI12 y la información de asignación ZI.

Estas dimensiones de unión se pueden emitir preferentemente en una etapa de procedimiento S10, preferentemente en forma de un elemento de datos BD a través de una interfaz de datos.

- 35 Las etapas S4 a S9 se pueden realizar preferentemente en el procedimiento de acuerdo con la invención para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida de acuerdo con una forma de realización. Lo mismo se aplica a la etapa S10, que se va a llevar a cabo preferentemente.

En la etapa S10, se proporciona preferentemente a través de una interfaz de datos una información que indica la posición de los patrones y preferentemente también la posición de manchas de antígeno individuales y manchas de referencia individuales sobre la micromatriz de antígeno.

- 40 La asignación de patrones de manchas de antígeno a tipos de antígeno respectivos que tienen lugar en la etapa S7 tiene lugar preferentemente de la manera que se ilustra en la figura 11b. En este sentido, en una etapa S71, se determina una sucesión espacial de la posición de referencia del patrón de referencia y de las respectivas posiciones adicionales de los patrones de manchas de antígeno adicionales respectivos. Esta posición puede denominarse también como posiciones a lo largo de una dirección de disposición asumida en particular de los patrones sobre la superficie de sustrato.

En una etapa S72 tiene lugar una provisión de un conjunto de datos de sucesión ADS, que indica una sucesión de tipos de antígeno. Esta es en particular de una sucesión espacial de tipos de antígeno a lo largo de una dirección de disposición de patrones.

- 50 La figura 11c ilustra un conjunto de datos de sucesión a modo de ejemplo ADS, que para una sucesión de patrones a lo largo de una dirección de disposición ANR para posiciones posteriores en campos PN correspondientes indica tipos de antígeno AT1, AT2, AT3 correspondientes respectivos en campos AT correspondientes. El conjunto de datos de sucesión ADS indica así una sucesión espacial de tipos de antígeno respectivos para posiciones respectivas a lo largo de una dirección de disposición ANR de patrones de manchas. Asimismo, se indican también para posiciones determinadas correspondientes tipos de patrón de referencia R1, R2, en campos correspondientes RT. En este ejemplo de realización preferido está presente un primer y un segundo patrón de referencia. Para el experto en la técnica, se entiende que en el caso de un solo patrón de referencia, solo está presente un tipo de patrón de referencia R1.

En una subetapa S73 de la figura 11b, tiene lugar entonces una creación de información de asignación ZI, que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos. Esto tiene lugar basándose en la posición de referencia detectada, la posición adicional respectiva detectada de los patrones de manchas de antígeno respectivos y el conjunto de datos de secuencia ADS.

- 5 Preferentemente, en el transcurso del procedimiento se detecta también una posición de referencia adicional de un segundo patrón de referencia y se tiene en cuenta en el transcurso de la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos. Esto permite una compensación o consideración de una rotación de 180° no deseada de la micromatriz de antígeno.

- 10 Para ello, la figura 11a muestra etapas que se van a llevar a cabo preferentemente. Tras la etapa S5 descrita anteriormente, tiene lugar entonces en una etapa S5A una detección del segundo patrón de referencia así como de una segunda posición de referencia asociada basándose en la primera información de imagen. Sigue entonces la etapa S6 descrita anteriormente. En una etapa posterior S7A, tiene lugar entonces la creación de información de asignación ZI, que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos. Esto tiene lugar basándose en la primera posición de referencia detectada, la segunda posición de referencia detectada y la posición adicional detectada de los patrones de manchas de antígeno respectivos como también, preferentemente, del conjunto de datos de secuencia.

La figura 20a muestra un primer patrón de referencia RM, un segundo patrón de referencia RM2 así como patrón de manchas de antígeno AM representado por una primera información de imagen BI11 en un primer canal de color, que es preferentemente un canal rojo.

- 20 La figura 20b muestra para ello en la primera información de imagen BI11 correspondientes posiciones de manchas de antígeno a modo de ejemplo AGSPI1, que se representan como rectángulos. Después de una detección de tales posiciones de manchas de antígeno AGSPI1, como también posiciones correspondientes para los patrones de referencia RM, RM2 de la figura 20a, las manchas individuales se pueden asociar a patrones individuales AM, RM, RM2, en particular patrones de línea. Para patrones AM, RM, RM2 respectivos se pueden determinar así posiciones respectivas a lo largo de la dirección de disposición ANR. Entonces, de la manera descrita anteriormente, preferentemente basándose en un conjunto de datos de secuencia se pueden asignar patrones de manchas de antígenos individuales a tipos de antígeno individuales.

- 30 La figura 21a muestra una coloración de manchas por un segundo colorante de la misma micromatriz de antígeno que en las figuras 20a y 20b. La figura 21a muestra una segunda información de imagen BI12, que representa una coloración de manchas, en particular, de las manchas de antígeno por el segundo colorante y, por lo tanto, en un segundo canal de color, preferentemente un canal verde.

- 35 Las posiciones de las manchas reconocidas basándose en la primera información de imagen BI11 de la figura 20b pueden usarse en este sentido para determinar, tal como se muestra en la figura 21b, en la segunda información de imagen BI21, si para determinadas manchas de antígeno y por lo tanto para determinados tipos de antígeno están presentes uniones de determinados anticuerpos de la muestra biológica. Por medio de esta determinación o evaluación pueden determinarse entonces dimensiones de unión para tipos de antígeno respectivos y, preferentemente, proporcionarse a continuación.

- 40 En el transcurso de las etapas de procedimiento S5 y S6 mencionadas anteriormente con respecto a la figura 10, se pueden llevar a cabo etapas parciales de procedimiento preferidas, tal como se representa en la figura 14. En una etapa de procedimiento S20, tiene lugar entonces un reconocimiento de varios patrones potenciales basándose en al menos una primera información de imagen. En una etapa de procedimiento adicional S21, tiene lugar entonces una detección de distancias de manchas medias regulares respectivas de manchas dentro de un patrón reconocido en cada caso para el patrón potencial respectivo reconocido. En una etapa S22 tiene lugar entonces un elección de uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia basándose en las distancias de manchas medias detectadas. Esto puede llevarse a cabo, tal como resulta para un experto en la materia, también para el segundo patrón de referencia.

Ahora se explica a continuación de qué manera puede tener lugar en detalle un reconocimiento de manchas individuales y entonces un reconocimiento de patrones o una asignación de manchas a patrones. Para ello, la figura 15 etapas que van a llevarse a cabo preferentemente.

- 50 Con el uso o basándose en la primera información de imagen BI11 de la figura 20a, tiene lugar en primer lugar en una etapa S30 por medio de una transformación de Hough una identificación de objetos circulares en la primera imagen BI11.

- 55 En una etapa S31, tiene lugar para cada círculo hallado una extracción de propiedades para los objetos circulares identificados, tales como, por ejemplo, un contorno y/o propiedades de intensidad. Las propiedades pueden ser la circunferencia de un círculo, una desviación de un círculo libre perfecto o la intensidad promedio de un objeto.

En una etapa S32 tiene lugar entonces con el uso de una máquina de vector de soporte una clasificación de los objetos circulares propuestos de la transformación de Hough con sus propiedades en una "mancha" de primera

clase o un "artefacto de imagen" de segunda clase. Solo aquellas zonas de imagen u objetos, que se clasifican como manchas, se usan a continuación.

Para cada zona de imagen clasificada como mancha puede determinarse o haberse determinado entonces ya en la etapa S31 una posición sobre la micromatriz de antígeno o en la información de imagen BI11 en posición X o Y. En una etapa S33 puede tener lugar entonces una agrupación de manchas para formar un patrón o un patrón de línea o una línea. En este sentido se crea una lista para las manchas que se clasifica por medio de posición Y en la imagen. A continuación se toma una mancha de la lista y se determina su vecino más cercano en distancia euclídea. Cuando ambas manchas se encuentran en un ángulo de aproximadamente 90° entre sí o forman una recta, que forma un ángulo de 90° con respecto a la dirección de disposición, se supone que pertenecen a un mismo patrón o a una misma línea. Este valor de 90° también se puede dotar de una ventana de desenfoque de varios grados positivos-negativos. Si no se da una pertenencia tal de las dos manchas consideradas entre sí a un patrón o a una recta tal de aproximadamente 90° con respecto a la dirección de disposición de los patrones, se considera entonces la siguiente mancha de la lista clasificada según la separación o posición Y. Si ya no se pueden asignar manchas de la lista al patrón considerado actualmente o a la línea considerada actualmente, entonces se inicia un nuevo patrón o una nueva línea en una dirección perpendicular a la dirección de asignación de los patrones. Mediante un procedimiento de este tipo pueden asignarse entonces iterativamente las manchas a patrones respectivos o líneas respectivas.

En una etapa S34 tiene lugar entonces una enumeración de los patrones o patrones de línea. Esto tiene lugar preferentemente de tal manera que el patrón o la línea, cuyas manchas presentan la mayor distancia media entre sí, se puede adoptar como patrón de referencia o como patrón de línea de referencia. Preferentemente, se supone un segundo patrón de referencia como aquel patrón o aquella línea en el que / en la que las manchas presentan la menor distancia media entre sí.

En una etapa S35 pueden determinarse entonces, basándose en la segunda información de imagen BI12 de la figura 21b, para aquellas manchas que están asignadas a un patrón o a una línea, las intensidades o intensidades de píxeles respectivas por mancha en el segundo canal de color debido a una coloración por el segundo colorante. Esto tiene lugar preferentemente como el valor mediano de las intensidades de una mancha.

Por último, en una etapa S36, se puede tener lugar una determinación de un valor de intensidad medio de un patrón de tal manera que se determina el valor mediano de las intensidades medianas de las manchas de un patrón. Este valor mediano es entonces una dimensión de unión que indica una unión o un grado de unión de anticuerpos de la muestra biológica a un determinado tipo de antígeno.

Es decir, en el transcurso de la etapa S9 para determinar la dimensión de unión basándose en la segunda información de imagen BI12 pueden usarse la información de posición de mancha de antígeno AGSPI obtenida previamente de la etapa S6 basándose en la primera información de imagen BI11 así como la información de posición de manchas de referencia RSPI obtenida en la etapa S5, tal como se representa en la figura 16. La detección de un patrón de manchas de referencia y de los patrones de manchas de antígeno respectivos incluye por tanto una detección de posiciones de manchas individuales y una asignación de manchas o posiciones de manchas al patrón de referencia y a los patrones de manchas de antígeno respectivos.

Preferentemente, para la determinación de una dimensión de unión se usa un valor umbral proporcionado a través de un elemento de datos, que se puede aplicar a la intensidad mediana determinada para un patrón o un tipo de antígeno. Si el valor de intensidad mediano de un patrón cae por debajo del valor umbral, entonces se supone que no hay unión de anticuerpos en absoluto. Solo en el caso de que el valor mediano de un patrón exceda el valor umbral predefinido, se emite un valor que indica que se da una unión de anticuerpos al tipo de antígeno correspondiente.

La emisión de las dimensiones de unión puede tener lugar a través de un elemento de datos, en el que, tal como se representa en la figura 12, un conjunto de datos BD indica una asignación de dimensiones de unión BM a tipos de antígeno AT correspondientes. El conjunto de datos BD puede ser, por ejemplo, una lista. Para un tipo de antígeno AT1, está contenida entonces una dimensión de unión BM1, así como correspondientes dimensiones de unión BM2, BM3 para correspondientes tipos de antígeno AT2, AT3.

Tal como se ha descrito anteriormente, en una forma de realización alternativa, el patrón de referencia con respecto a un patrón directamente adyacente a lo largo de la dirección de disposición de los patrones, presenta una distancia de proximidad que se diferencia de las otras distancias de proximidad de los patrones de manchas de antígeno. Para ello, la figura 22a muestra una forma de realización A21, en la que solo está presente un patrón de referencia RM. El patrón de referencia RM presenta una distancia de proximidad DI11 al patrón directamente adyacente siguiente AM1 en la dirección de disposición ANR, que es mayor que la distancia de proximidad DI12 de los otros patrones AM1, AM2, AM3 a sus patrones directamente adyacentes AM2 en la dirección de la disposición ANR, AM3, RM.

En esta forma de realización, en el transcurso del procedimiento para la detección automatizada así como del procedimiento de procesamiento de imágenes automatizado pueden realizarse preferentemente entonces las siguientes etapas:

- reconocer varios patrones AM1, AM2, AM3, RM basándose en la primera información de imagen;

- detectar distancias de proximidad DI11, DI12 respectivas de los patrones reconocidos, en particular a lo largo de la dirección de disposición de los patrones, a sus patrones adyacentes siguientes en cada caso, en particular directa o inmediatamente, en la dirección de la dirección de disposición de los patrones;
- seleccionar uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia basándose en las distancias de proximidad detectadas DI11, DI12.

En este sentido pueden usarse las posiciones de manchas de las manchas de referencia y de las manchas de antígeno, tal como se muestra la figura 20b, detectadas basándose en la primera información de imagen BI11, para asignar, tal como se ha descrito anteriormente en detalle, las manchas a patrones o patrones de línea respectivos, de modo que se reconocen varios patrones basándose en la primera información de imagen BI11. A lo largo o en la dirección de disposición ANR de los patrones, pueden determinarse distancias de proximidad DI11, DI12 respectivas entre los patrones, es decir, por ejemplo, una distancia de proximidad para el patrón de referencia al patrón siguiente situado a la derecha del mismo, directamente adyacente, en la dirección de la dirección de disposición ANR. Si el patrón de referencia presenta una distancia de proximidad, que se diferencia de las distancias de proximidad de los patrones de manchas de antígeno, entonces se puede detectar y reconocer de manera segura el patrón de referencia.

Tal como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con una forma de realización alternativa está previsto que dentro del patrón de referencia y dentro del patrón de manchas de antígeno las manchas asociadas en cada caso presenten un tamaño igual respectivo, diferenciándose el tamaño de las manchas de referencia del patrón de referencia de los tamaños de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno. Para ello, la figura 22b muestra una forma de realización A22 preferida de una micromatriz de antígeno, en la que solo está presente un patrón de referencia RM. Las manchas de referencia del patrón de referencia RM presentan un tamaño igual. Este tamaño se diferencia del mismo tamaño común que presentan las manchas de antígeno de los patrones de antígeno AM.

En esta forma de realización, en el transcurso del procedimiento para la detección automatizada así como del procedimiento de procesamiento de imágenes automatizado pueden realizarse preferentemente entonces las siguientes etapas:

- reconocer varios patrones RM, AM1, AM2, AM3 basándose en la al menos una primera información de imagen,
- detectar tamaños de mancha respectivos para el patrón reconocido RM respectivo, AM1, AM2, AM3;
- seleccionar uno de los patrones reconocidos como patrón de referencia RM basándose en los tamaños de manchas detectados

En este sentido pueden usarse las posiciones de manchas de las manchas de referencia y de las manchas de antígeno, tal como se muestra la figura 20b, detectadas basándose en la primera información de imagen BI11, para asignar, tal como se ha descrito anteriormente en detalle, las manchas a patrones o patrones de línea respectivos, de modo que se reconocen varios patrones basándose en la primera información de imagen BI11. Para cada mancha se determina entonces una propiedad tal como la circunferencia del círculo u objeto circular identificado. Con ello, manchas de la misma circunferencia o del mismo tamaño se pueden asignar al mismo patrón. Aquel patrón, cuyas manchas presenten de media el tamaño de mancha más grande en comparación con los otros patrones, se puede detectar entonces como patrón de referencia.

La figura 8 muestra un dispositivo V1 de acuerdo con la invención de acuerdo con una forma de realización para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra. El dispositivo V1 comprende un denominado dispositivo de microscopio.

Una micromatriz de antígeno C puede observarse a través de un objetivo O por medio de al menos una cámara K1, K2.

Las cámaras K1, K2 pueden denominarse unidades de adquisición de imágenes. La estructura de la figura 8 para el dispositivo V1 prevé una separación explícita de dos canales de color o canales ópticos antes de una adquisición de información de imagen por unidades de adquisición de imagen separadas K1, K2. Para experto en la materia es evidente que mediante un intercambio temporal de filtros ópticos pueda realizarse un dispositivo de este tipo también estando prevista solamente una única unidad de adquisición de imágenes, pero mediante el uso de diferentes filtros ópticos para diferentes canales de color, la información de imagen respectiva descrita anteriormente se puede adquirir en los canales de color respectivos.

Una fuente de luz de fluorescencia LQ emite una luz de excitación AL que se filtra por medio de un filtro de luz de excitación F1 de modo que un espectro de luz de excitación AL descrito en la figura 7 se dirige al espejo dicróico SP1. El espejo dicróico SP1 dirige entonces esta luz de excitación AL hacia el objetivo O, a través del cual la luz de excitación incide entonces sobre la micromatriz de antígeno C y sus manchas. La primera y segunda radiación fluorescente emitida por la micromatriz de antígeno C o los colorantes fluorescentes de las manchas llega entonces a través del objetivo O a través del espejo dicróico SP1 hasta un filtro óptico F2, que bloquea la luz de excitación AL

o su espectro y transmite la radiación fluorescente del primer canal de color y también de un segundo canal de color. La radiación fluorescente llega entonces a otro espejo dicróico SP2 que refleja radiación fluorescente del primer canal de color o primera radiación fluorescente en una primera unidad de adquisición de imágenes o cámara K1. Preferentemente, mediante un filtro óptico FR se lleva a cabo también una filtración de la primera radiación fluorescente del espectro de entrada. El filtro FR es en particular un filtro de canal rojo.

El espejo dicróico SP2 transmite la segunda radiación fluorescente o luz del segundo canal de color a una segunda unidad de adquisición de imágenes o cámara K2. Preferentemente, esta radiación se filtra de nuevo mediante filtro óptico FG adicional, siendo el filtro óptico FG en particular un filtro de canal verde.

La primera cámara K1 detecta entonces la primera información de imagen BI1 y la proporciona a la unidad de cálculo R. La segunda unidad de adquisición de imágenes K2 detecta entonces la segunda información de imagen BI2 y la proporciona a la unidad de cálculo R2.

La primera unidad de adquisición de imágenes y la segunda unidad de adquisición de imágenes como ejemplo de al menos una unidad de adquisición de imágenes se diseñan entonces para adquirir una primera información de imagen BI1, que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno por un primer colorante, en particular un primer colorante fluorescente. Asimismo, la al menos una unidad de adquisición de imágenes K1, K2 está diseñada para adquirir una segunda información de imagen BI2, que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por un segundo colorante, en particular un segundo colorante fluorescente, después de la incubación de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante.

La unidad de cálculo R está diseñada en particular para llevar a cabo una o varias de las etapas S4, S5, S6, S7 así como S9 descritas anteriormente con respecto al procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos así como al procedimiento de un procesamiento de imágenes automatizado para la detección de anticuerpos, de la figura 10. Para ello, la unidad de cálculo R controla las unidades de adquisición de imágenes K1, K2 así como la fuente de luz de fluorescencia LQ de manera correspondiente.

El dispositivo V1 de la figura 8 presenta asimismo preferentemente una interfaz de datos DS1, a través de la cual se pueden recibir o enviar elementos de datos DA. En particular, en este caso a través de tales elementos de datos DA pueden transmitirse dimensiones de unión y, preferentemente, también se pueden recibir elementos de datos que indican un valor umbral.

A través de la interfaz de datos DS1, el dispositivo V1 puede intercambiar elementos de datos DA. Tales elementos de datos DA pueden ser entonces uno o varios de los siguientes elementos de datos:

- un elemento de datos de valor umbral TH que se va a recibir de la figura 17,
- un conjunto de datos de sucesión que se va a recibir ADS de la figura 11c
- un conjunto de datos de imagen BD que se van a emitir o que se van a proporcionar de la figura 10,
- una información de asignación ZI que se va a emitir o a proporcionar de la figura 11a.

El dispositivo V1 presenta, por lo tanto, con la fuente de luz de fluorescencia LQ, una unidad de iluminación para emitir luz de excitación para excitar una emisión de primera radiación fluorescente de un primer intervalo de longitud de onda por el primer colorante. Asimismo, la fuente de luz LQ representa también al menos una unidad de iluminación para emitir luz de excitación para excitar una emisión de segunda radiación fluorescente de un segundo intervalo de longitud de onda por el segundo colorante.

La figura 17 muestra etapas preferidas en el transcurso del procedimiento descrito para la detección automatizada de anticuerpos y/o del procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado.

En una etapa S40 tiene lugar, tal como se ha descrito anteriormente, en el segundo canal de color o la segunda información de imagen BI12 de las figuras 21a y 21b, una identificación de manchas de antígeno con el uso de informaciones de posición de manchas de antígeno AGSPI o la información de posición adicional AGMPI. Además, preferentemente en el caso de que las manchas de referencia presenten también un antígeno, un uso de la información de posición de referencia RPI o la información de posición de mancha de referencia RSPI tiene lugar una identificación de las manchas de referencia.

De la manera descrita anteriormente, en la etapa S41 tiene lugar una asignación de zonas de imagen o manchas a patrones determinados y, por lo tanto, también a tipos de antígeno determinados.

En una etapa S42 tiene lugar una determinación de una intensidad media o una intensidad mediana de un patrón en el segundo canal de color o basándose en la segunda información de imagen.

En la etapa de procedimiento S43 tiene lugar una provisión o recepción de un conjunto de datos TH, que indica un

valor umbral que se aplicará a las intensidades medianas.

En la etapa S43 tiene lugar entonces una aplicación de este valor umbral a las intensidades medias determinadas de los patrones respectivos.

5 En una etapa S44 tiene lugar entonces una determinación de dimensiones de unión respectivas para los patrones respectivos.

10 En una etapa S44a que se va a llevar a cabo preferentemente, tiene lugar entonces una emisión de un mensaje al usuario, preferentemente por medio de una unidad de visualización óptica o preferentemente por medio de un elemento de datos que se emitirá a través de una interfaz de datos, en el caso de que las manchas de referencia del patrón de referencia en el segundo canal de color o la segunda información de imagen no presenten una coloración o intensidad media suficiente. Esto tiene lugar en particular en el caso de que las manchas de referencia del patrón de referencia presenten un anticuerpo, en particular IgG, mediante el cual se puede controlar si tuvo lugar una incubación adecuada de la micromatriz de antígeno con una muestra biológica líquida de un paciente humano.

En la etapa S45 tiene lugar entonces la emisión de las dimensiones de unión.

15 La figura 9 muestra una forma de realización de un dispositivo de red de datos V2 de acuerdo con la invención, que preferentemente también se puede denominar sistema de nube.

El dispositivo de red de datos V2 para la evaluación de imágenes automatizada para detectar anticuerpos en una muestra líquida y biológica presenta al menos una interfaz de datos DS, a través de la cual pueden intercambiarse elementos de datos DA2 a través de una red de datos.

20 El dispositivo V2 presenta al menos una unidad de cálculo R2, que está conectada preferentemente con la interfaz de datos DS a través de un bus de datos DB. Preferentemente, el dispositivo de red de datos V2 presenta preferentemente al menos una unidad de memoria MEM.

25 La al menos una interfaz de datos DS está diseñada para recibir una primera información de imagen que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno por un primer colorante. La al menos una interfaz de datos está diseñada asimismo para recibir una segunda información de imagen que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno por un segundo colorante después de la incubación de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y un conjugado que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante.

30 La unidad de cálculo R2 está diseñada para llevar a cabo las etapas descritas anteriormente con respecto al procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado, en particular una o varias de las etapas S4, S5, S6, S7 y S9. Asimismo, la unidad de cálculo R2 está diseñada para llevar a cabo otras etapas que se van a llevar a cabo preferentemente del procedimiento para el procesamiento de imágenes automatizado, que se expusieron previamente en detalle.

35 El dispositivo V2 de la figura 9 está diseñado asimismo preferentemente para, a través de la interfaz de datos DS, proporcionar elementos de datos DA2 que representan información que indican la dimensión de unión respectiva de anticuerpos a los tipos de antígeno respectivos.

Asimismo, la interfaz de datos DS está diseñada asimismo para indicar a través de elementos de datos posiciones de manchas de antígeno y/o patrones, así como manchas de referencia o patrones de referencia.

40 En un procedimiento que lleva a cabo el dispositivo V2 de la figura 9, tiene lugar un procesamiento de imágenes automatizado para la detección de anticuerpos en una muestra biológica líquida en particular porque la primera información de imagen se recibe a través de la al menos una interfaz de datos DS y se proporciona por medio de la al menos una unidad de memoria MEM, en la que asimismo la segunda información de imagen se recibe a través de la interfaz de datos DS y se proporciona igualmente por medio de la unidad de memoria MEM.

45 Preferentemente, el dispositivo V2 está diseñado para recibir a través de la interfaz de datos DS un elemento de datos que indica determinados tipos de antígeno, sobre los que se emitirán dimensiones de unión. Tiene lugar entonces preferentemente una evaluación para estos tipos de antígeno específicos indicados y también una transmisión de un elemento de datos que indica la dimensión de unión de los tipos de antígeno determinados correspondientes.

50 Aunque se han descrito algunos aspectos en relación con un dispositivo, se entiende que estos aspectos también representan una descripción de los procedimientos correspondientes, de modo que un bloque o un elemento constructivo de un dispositivo también debe entenderse como una etapa de procedimiento correspondiente o como una característica de una etapa de procedimiento. De manera análoga, los aspectos que se han descrito en relación con una o como una etapa de procedimiento, también representan una descripción de un bloque o detalle o característica correspondiente de un dispositivo correspondiente.

En función de determinados requisitos de implementación, ejemplos de realización de la invención pueden

implementar las unidades de cálculo R, R2 en hardware y/o software. Una implementación de una unidad informática R mencionada en este caso, R2 puede tener lugar en este caso como al menos una unidad de cálculo o bien mediante varias unidades de cálculo interconectadas. La implementación se puede llevar a cabo con el uso de un medio de memoria digital, por ejemplo un disquete, un DVD, un disco Blu-Ray, un CD, una ROM, una PROM, una EPROM, una EEPROM o una memoria FLASH, un disco duro u otra memoria magnética u óptica, en la que se almacenan señales de control legibles electrónicamente, que puede interaccionar o interaccionan con un componente de hardware programable de tal manera que se lleva a cabo el procedimiento respectivo.

Un componente de hardware programable puede estar diseñado como unidad informática por un procesador, un procesador de ordenador (CPU = Unidad Central de Procesamiento), un ordenador, un sistema informático, un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC = Application-Specific Integrated Circuit), un circuito integrado (IC = Integrated Circuit), un sistema de una micromatriz (SOC = System on Chip), un elemento lógico programable o una matriz de puertas programables en campo con un microprocesador (FPGA = Field Programmable Gate Array).

Por lo tanto, el medio de memoria digital puede ser legible por máquina o por ordenador. Es decir, algunos ejemplos de realización comprenden un soporte de datos, que presenta señales de control legibles electrónicamente, que son capaces de interaccionar con un sistema informático programable o un componente de hardware programable de tal manera que se lleve a cabo uno de los procedimientos descritos en el presente documento. En general, ejemplos de realización o partes de los ejemplos de realización de la presente invención se pueden implementar como programa, firmware programa informático o producto de programa informático con un código de programa o como datos, donde el código de programa o los datos es o son efectivos en el sentido de llevar a cabo uno de los procedimientos o una parte de un procedimiento cuando el programa se ejecuta en un procesador o un componente de hardware programable.

REIVINDICACIONES

1. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22),
que presenta una superficie de sustrato plana (SO) con manchas de antígeno (AS) aplicadas sobre la misma y separadas entre sí, que presentan un mismo colorante común,
- 5 en la que las manchas de antígeno (AS) forman cantidades de manchas de antígeno (AG) respectivas, que forman correspondientes patrones de mancha de antígeno (AM, AM1, AM2) regulares respectivas,
en la que las manchas de antígeno (AS) de una misma cantidad de manchas de antígeno presentan un mismo tipo de antígeno común y en la que dos o más cantidades de manchas de antígeno (A1, A2) presentan tipos de antígeno diferentes,
- 10 **caracterizada porque** sobre la superficie de sustrato (SO) están aplicadas, además, manchas de referencia (RS), que forman una cantidad de manchas de referencia que configuran un patrón de referencia regular (RM),
porque el patrón de referencia se diferencia de los patrones de manchas de antígeno en cuanto a su regularidad,
en la que las manchas de referencia (RS) presentan igualmente el mismo colorante común.
2. Micromatriz de antígeno según la reivindicación 1 (A2, A11, A12, A21, A22),
- 15 **caracterizada porque** el patrón de referencia (RM) se diferencia, en cuanto a su regularidad, del patrón de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) en uno o varios de los siguientes criterios:
 - dentro del patrón de referencia (RM) y dentro del patrón de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) se suceden cada una de las manchas correspondientes a distancias regulares (SD1, SD2) respectivas, en donde la distancia regular (SD1) de las manchas de referencia (RS) del patrón de referencia (RM) se diferencia de las distancias regulares (SD2) de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2);
 - 20 ◦ el patrón de referencia (RM) presenta, con respecto a un patrón directamente adyacente, una distancia de proximidad que se diferencia de las otras distancias de proximidad de los patrones de manchas de antígeno;
 - dentro del patrón de referencia (RM) y dentro del patrón de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) cada una de las manchas correspondientes presenta un mismo tamaño respectivo, de modo que el tamaño de las manchas de referencia del patrón de referencia (RM) se diferencia de los tamaños de las manchas de antígeno de los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2).
 - 25
3. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según las reivindicaciones 1 o 2,
caracterizada porque el patrón de referencia (RM) y los patrones de antígeno (AM, AM1, AM2) están dispuestos a lo largo de una dirección de disposición (ANR) de los patrones,
- 30 y porque el patrón de referencia (RM) y los patrones de antígeno (AM, AM1, AM2) presentan direcciones de propagación respectivas (ABR), que discurren esencialmente en perpendicular a la dirección de disposición (ANR) de los patrones (RM, AM, AM1, AM2).
4. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según s reivindicaciones 1 o 2,
caracterizada porque las manchas de referencia de la cantidad de manchas de referencia forman un patrón de líneas de referencia (RM) y porque, además, las manchas de antígeno respectivas de las cantidades de manchas de antígeno respectivas forman patrones de líneas de antígeno (AM, AM1, AM2) respectivos,
- 35 en la que los patrones de líneas discurren esencialmente en paralelo entre sí.
5. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según la reivindicación 1,
caracterizada porque el mismo colorante común es un colorante fluorescente.
- 40 6. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según la reivindicación 1,
caracterizada porque el segundo colorante es un colorante fluorescente.
7. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 6,
caracterizada porque las manchas de referencia (RS) de la cantidad de manchas de referencia presentan el colorante en una concentración de colorante, que es mayor que las concentraciones de colorante en las que las manchas de antígeno de las cantidades de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) presentan el colorante.
- 45 8. Micromatriz de antígeno (A2, A11, A12) según una de las reivindicaciones 1 a 5,
en la que las manchas de referencia (RS) son primeras manchas de referencia que forman una primera cantidad de manchas de referencia, que a su vez forma un primer patrón de referencia regular (RM),
caracterizada por segundas manchas de referencia, que forman una segunda cantidad de manchas de referencia,
50 que a su vez configuran un segundo patrón de referencia regular (RM2), en donde las segundas manchas de referencia presentan igualmente el mismo colorante común,
además, **caracterizada porque** el segundo patrón de referencia (RM2) se diferencia de los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) de las cantidades de manchas de antígeno y, adicionalmente, también del primer patrón de referencia (RM) de las primeras manchas de referencia en cuanto a su regularidad.
- 55 9. Micromatriz de antígeno según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las manchas de referencia (RS) presentan, además, un antígeno.
10. Micromatriz de antígeno según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las manchas de referencia (RS)

presentan, además, un anticuerpo, en particular IgG.

11. Procedimiento para la detección automatizada de anticuerpos en una muestra biológica líquida por medio del uso de una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22), que comprende las etapas de

- 5 proporcionar una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10, (S1)
- incubar las manchas de la micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) con la muestra biológica, (S2)
- incubar las manchas con un conjugado, que presenta un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante, (S3)
- adquirir o proporcionar al menos una primera información de imagen (BI1, BI11), que representa una coloración de las manchas de referencia y de las manchas de antígeno por medio del primer colorante, (S4)
- 10 detectar el patrón de referencia (RM) así como una posición de referencia asociada basada en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11), (S5)
- detectar los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) respectivos así como posiciones adicionales asociadas respectivas basadas en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11), (S6)
- 15 basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, elaborar una información de asignación (ZI), que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) respectivos a tipos de antígeno respectivos, (S7)
- adquirir o proporcionar una segunda información de imagen (BI2, BI12), que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno por medio del segundo colorante, (S8)
- 20 basándose en la segunda información de imagen (BI2, BI12) y la información de asignación (ZI), determinar dimensiones de unión respectivas, que indican uniones respectivas de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos (S9).

12. Procedimiento para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida, que comprende

- 25 proporcionar o adquirir una primera información de imagen (BI1, BI11), que representa una coloración de manchas de referencia y de manchas de antígeno de una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22), según una de las reivindicaciones 1 a 10, por medio de un primer colorante, (S4)
- detectar el patrón de referencia (RM) así como una posición de referencia asociada, (S5)
- detectar los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) respectivos así como las respectivas posiciones adicionales asociadas, basadas en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11), (S6)
- 30 basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, elaborar una información de asignación (ZI), que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos, (S7)
- proporcionar o adquirir una segunda información de imagen (BI2, BI12), que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno de la micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) por medio de un segundo colorante después de incubar las manchas de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado, que presenta un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante, (S8)
- 35 basándose en la segunda información de imagen (BI2, BI12), determinar dimensiones de unión respectivas, que indican uniones respectivas de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos (S9).

- 40 13. Procedimiento según las reivindicaciones 11 o 12, en el que la micromatriz de antígeno es una micromatriz de antígeno según la reivindicación 8, en el que la posición de referencia es una primera posición de referencia, que comprende, además:

- 45 detectar el segundo patrón de referencia (RM2) así como una segunda posición de referencia asociada basada en la primera información de imagen (BI1, BI11),
- elaborar la información de asignación (ZI), que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos, basándose en la primera posición de referencia detectada, la segunda posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas.

14. Procedimiento según las reivindicaciones 11 o 12,

- 50 en el que la asignación de los patrones de manchas de antígeno detectados respectivos a los tipos de antígeno respectivos tiene lugar mediante

- determinación de una sucesión espacial de la posición de referencia y de las posiciones adicionales,
- provisión de un conjunto de datos de sucesión (ADS), que indica una sucesión de tipos de antígeno,
- 55 elaborar la información de asignación (ZI), que indica la asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a los tipos de antígeno respectivos, basándose en la posición de referencia detectada, las posiciones adicionales detectadas y el conjunto de datos de sucesión (ADS).

15. Procedimiento según la reivindicación 12,

en el que la primera información de imagen (BI1, BI11) se recibe a través de al menos una interfaz de datos (DS) y se proporciona por medio de al menos una unidad de memoria (MEM)

y en el que la segunda información de imagen (BI2, BI12) se recibe a través de la interfaz de datos (DS) y se proporciona por medio de la unidad de memoria (MEM).

16. Procedimiento para la producción de una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) para el inmunodiagnóstico, que comprende

- 5
 - proporcionar un sustrato con una superficie de sustrato plana (SO),
 - aplicar manchas de referencia (RS) sobre la superficie de sustrato plana (SO), así como
 - aplicar manchas de antígeno (AS) sobre la superficie de sustrato plana (SO),

en el que la aplicación de las manchas de referencia y de las manchas de antígeno (AS) se lleva a cabo de tal manera que las manchas de referencia (RS) y las manchas de antígeno (AS) de la micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) están realizadas de acuerdo con una micromatriz de antígeno según una de las reivindicaciones 1 a 10.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, que comprende además: fragmentar el sustrato (SU), para obtener varias micromatrices de antígeno (A11, A12).

18. Procedimiento según las reivindicaciones 16 o 17, en el que la superficie de sustrato (SO) es una superficie de un sustrato de vidrio o de un sustrato de vidrio revestido con una membrana y/o una lámina.

19. Dispositivo (V1) para un procesamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida, que comprende

al menos una unidad de adquisición de imágenes (K1, K2)

- 20
 - para adquirir una primera información de imagen (BI1, BI11), que representa una coloración de manchas de referencia (RS) y de manchas de antígeno (AS) de una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10 por medio de un primer colorante,
 - así como, además, para adquirir una segunda información de imagen (BI2, BI12), que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno (AS) de la micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10 por medio de un segundo colorante después de incubar las manchas de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado, que representa un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante,

así como, además, al menos una unidad de cálculo (R), que está diseñada para

- 30
 - basándose en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11) detectar el patrón de referencia (RM) así como una posición de referencia asociada,
 - basándose en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11) detectar el patrón de manchas de antígeno respectivo (AM) así como las respectivas posiciones adicionales asociadas,
 - basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, elaborar una información de asignación (ZI), que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos,
- 35
 - así como, basándose en la segunda información de imagen (BI2, BI12), determinar dimensiones de unión respectivas, que indican uniones respectivas de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.

20. Dispositivo según la reivindicación 19, que comprende además

- al menos una unidad de iluminación (FL) para emitir luz de excitación (AL) para excitar una emisión de una primera radiación fluorescente de un primer intervalo de longitud de onda por medio del primer colorante.

21. Dispositivo según la reivindicación 19, que comprende asimismo

- al menos una unidad de iluminación (FL) para emitir luz de excitación (AL) para excitar una emisión de una segunda radiación fluorescente de un primer intervalo de longitud de onda por el segundo colorante.

22. Dispositivo de red de datos (V2) para un tratamiento de imágenes automatizado para detectar anticuerpos en una muestra biológica líquida, que comprende

al menos una interfaz de datos (DS)

- 50
 - para recibir una primera información de imagen (BI1, BI11), que representa una coloración de manchas de referencia (RS) y de manchas de antígeno (AS) de una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10 por medio de un primer colorante,

- 5 ° así como, además, para recibir una segunda información de imagen (BI2, BI12), que representa una coloración potencial de las manchas de antígeno (AS) de la micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10 por medio de un segundo colorante después de incubar las manchas de la micromatriz de antígeno con la muestra biológica y con un conjugado, que representa un anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante,
- así como, además, al menos una unidad de cálculo (R2), que está configurada para
- 10 ° basándose en la al menos una primera información de imagen (BI1, BI11) detectar el patrón de referencia (RM) así como una posición de referencia asociada,
- 10 ° basándose en la al menos una primera información de imagen (BI2, BI12) detectar los patrones de manchas de antígeno (AM, AM1, AM2) respectivos así como las posiciones adicionales asociadas respectivas,
- 15 ° basándose en la posición de referencia detectada y las posiciones adicionales detectadas, elaborar una información de asignación (ZI), que indica una asignación de los patrones de manchas de antígeno respectivos a tipos de antígeno respectivos,
- 15 ° así como basándose en la segunda información de imagen (BI2, BI12) determinar dimensiones de unión respectivas, que indican uniones respectivas de anticuerpos de la muestra biológica a tipos de antígeno respectivos.
23. Producto de programa informático que comprende comandos que con la ejecución del programa por un ordenador hacen que este realice un procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 15.
- 20 24. Señal portadora de datos, que transmite el producto de programa informático según la reivindicación 23, siendo la señal portadora de datos preferentemente una señal de datos de descarga para transmitir el producto de programa informático.
- 25 25. Portaobjetos (OT), que comprende múltiples micromatrices de antígeno (A) según una de las reivindicaciones 1 a 10.
- 25 26. Kit para su uso en un procedimiento para detectar anticuerpos en una muestra, que comprende:
- al menos una micromatriz de antígeno (A2, A11, A12, A21, A22) según una de las reivindicaciones 1 a 10, así como asimismo un conjugado, que presenta un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante.
27. Kit según la reivindicación 26, en el que el segundo colorante es un colorante fluorescente, un sustrato cromógeno, una enzima o un sustrato para una reacción quimioluminiscente.
- 30

Fig. 1
Estado de la técnica

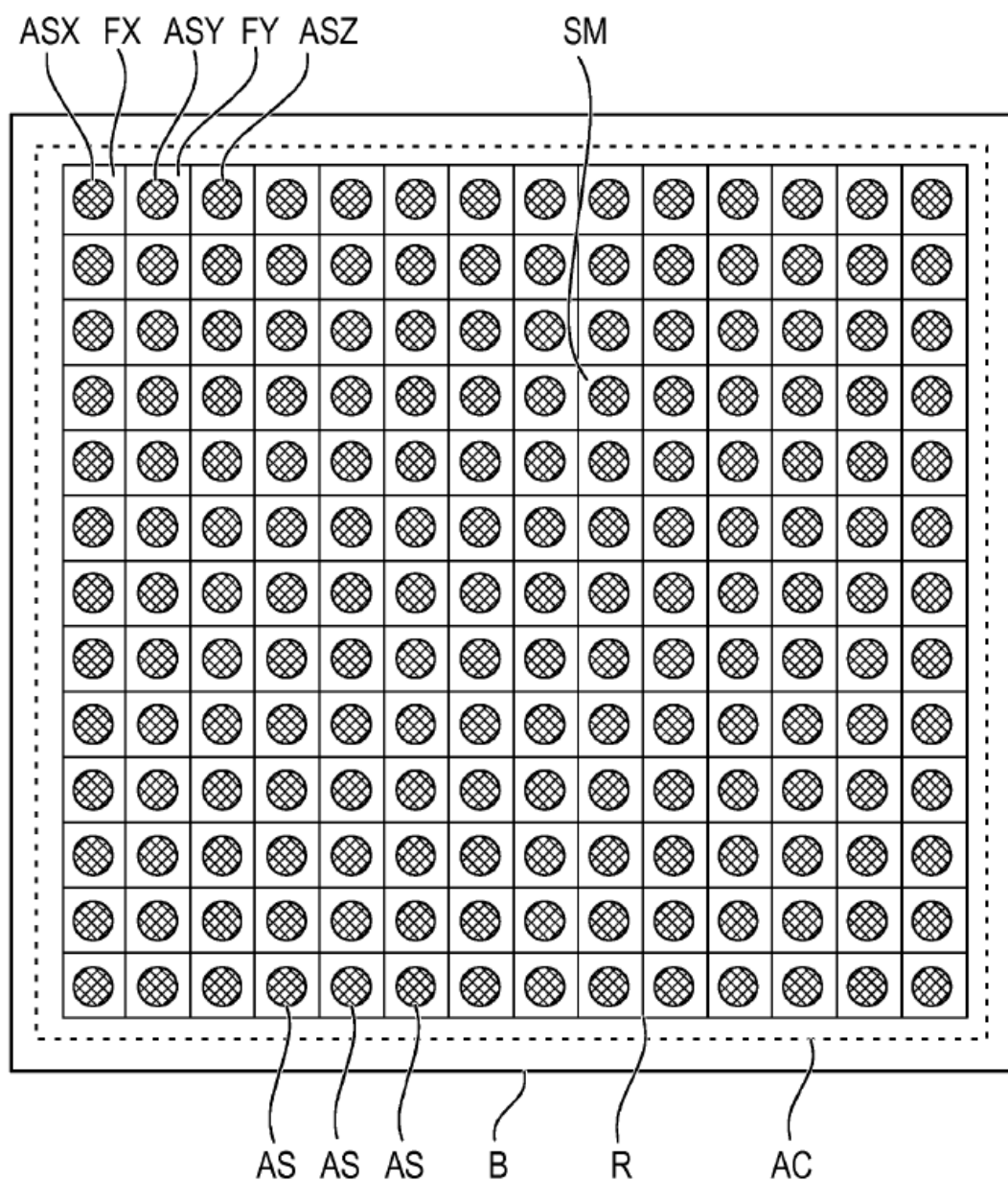
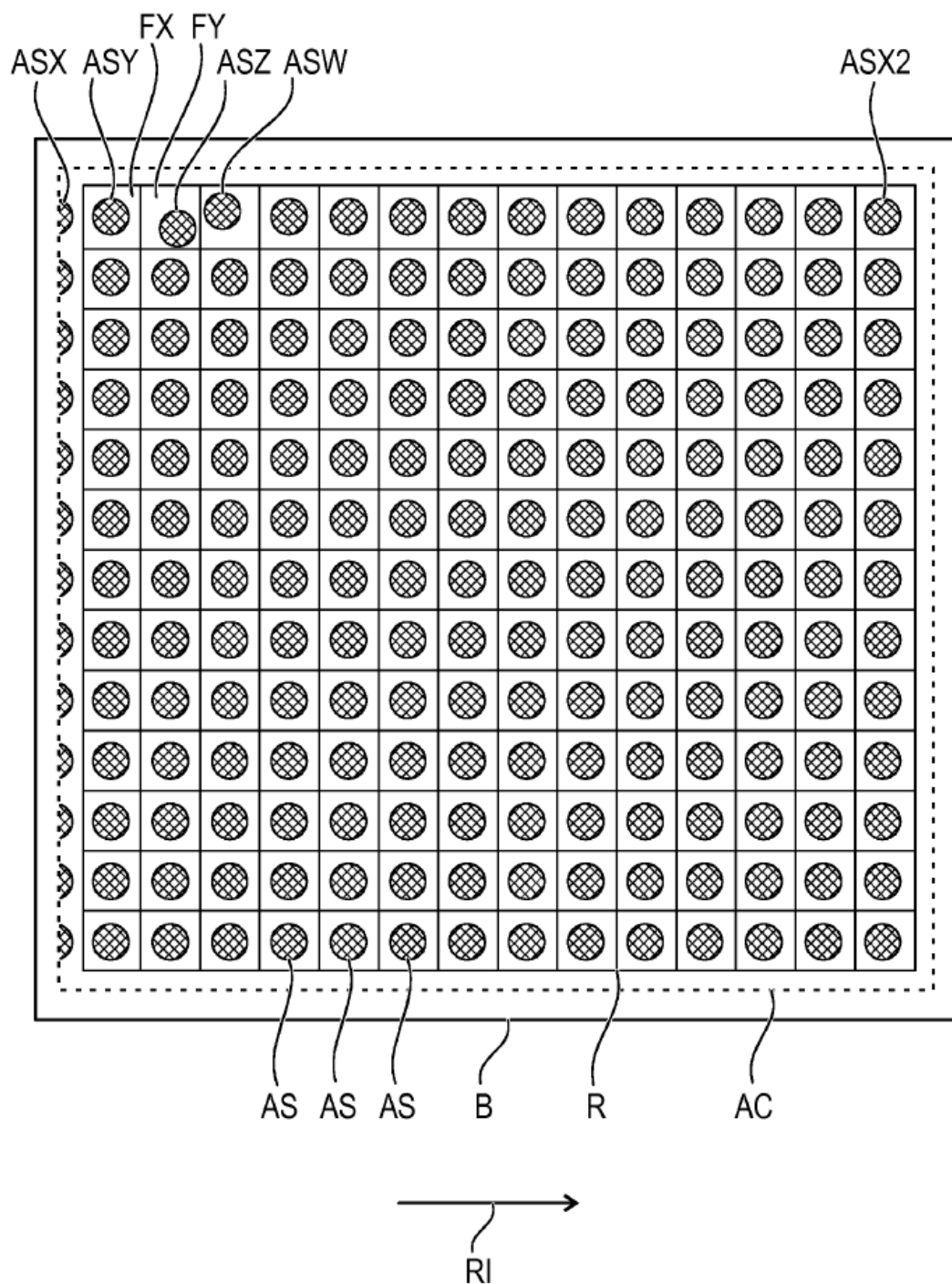
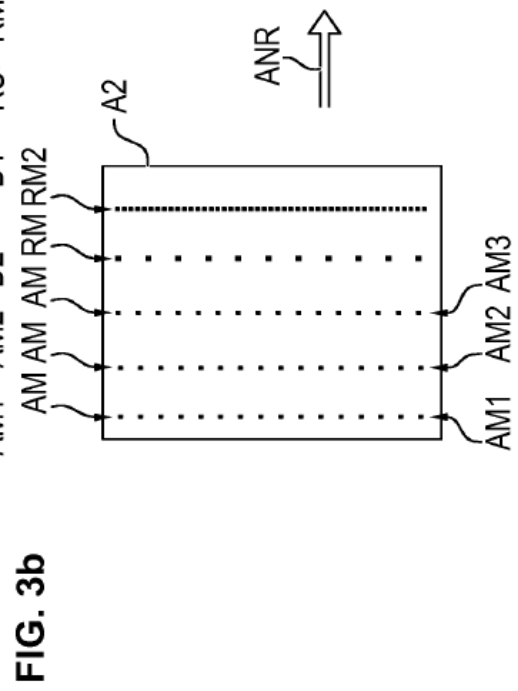
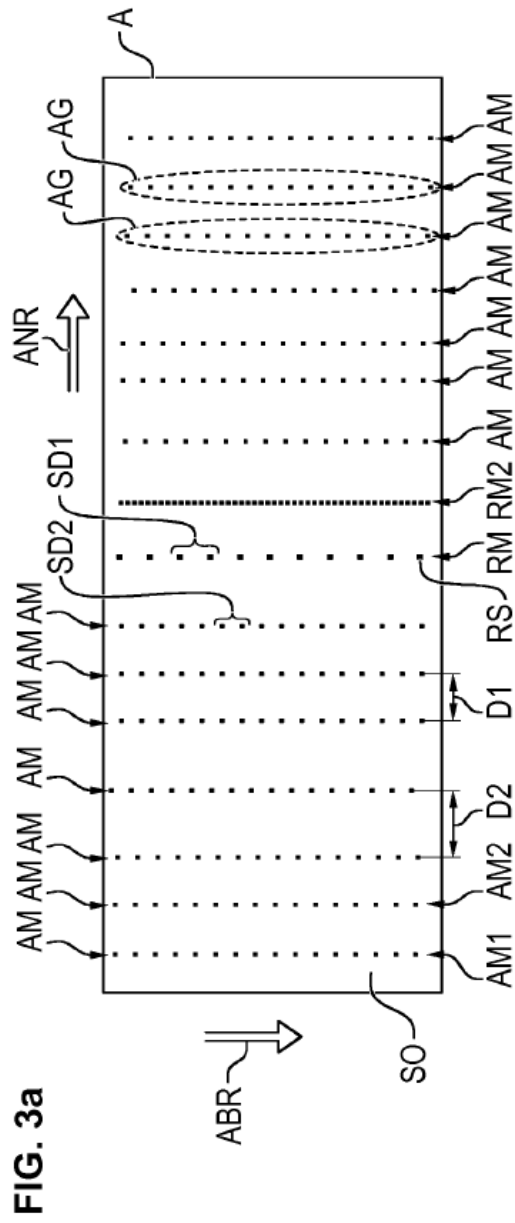


Fig. 2
Estado de la técnica





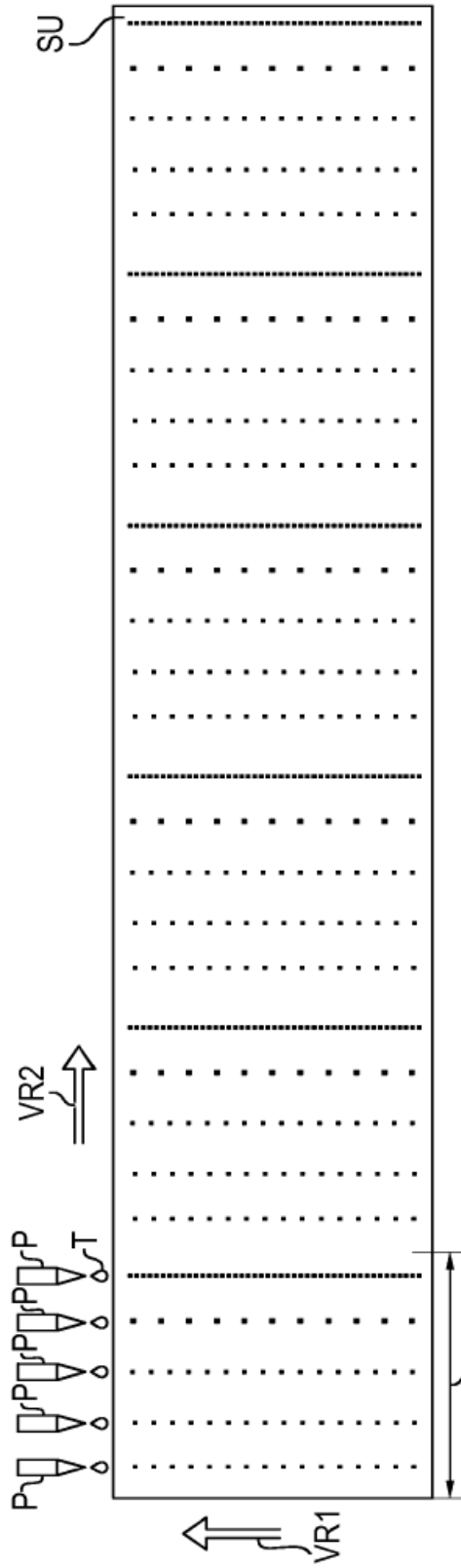


FIG. 4a

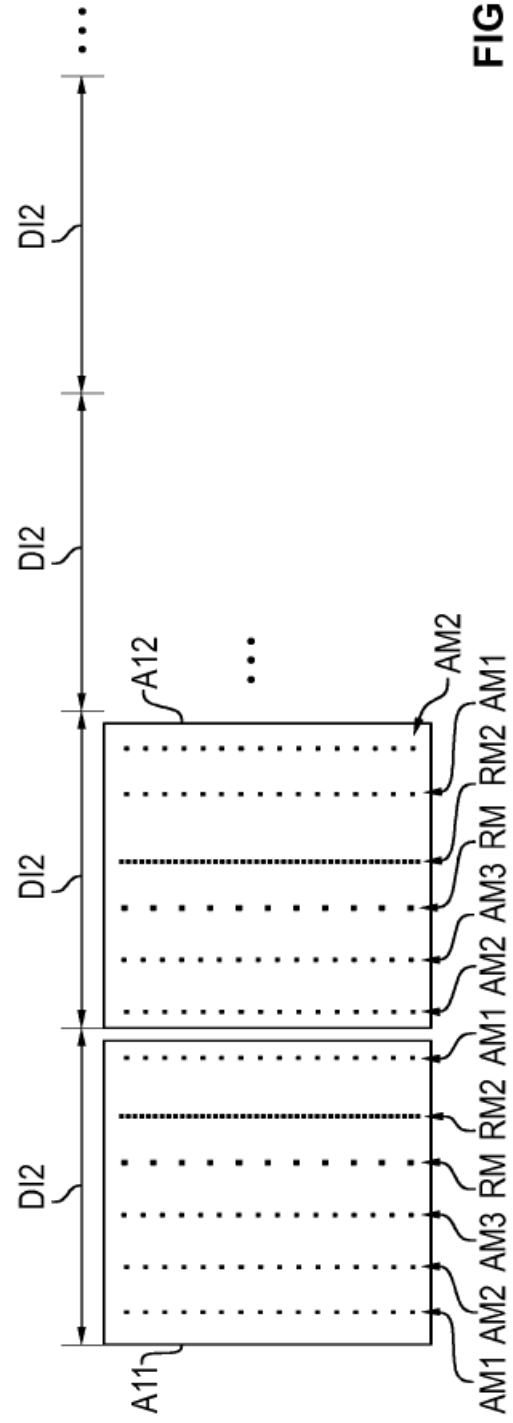
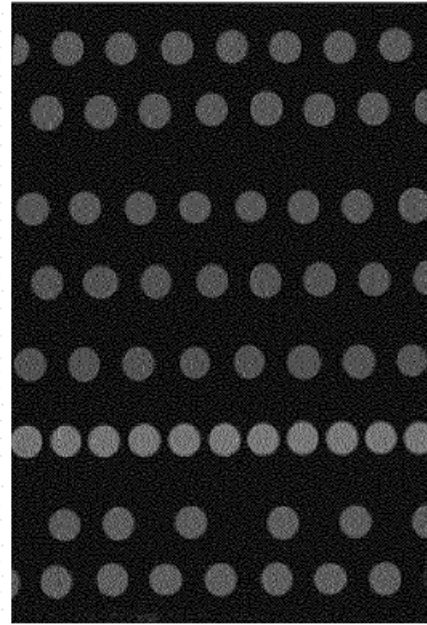


FIG. 4b

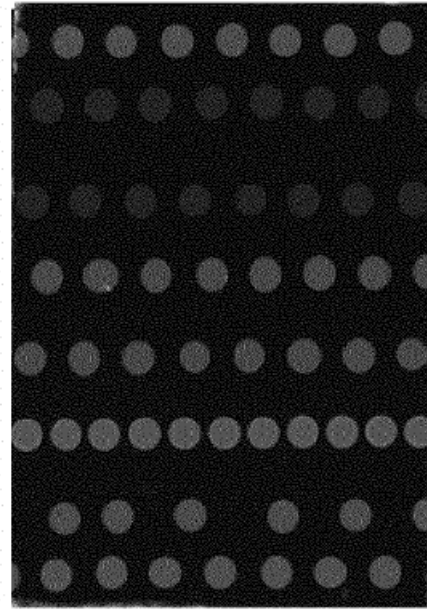
Fig.5a

BI1

BI2



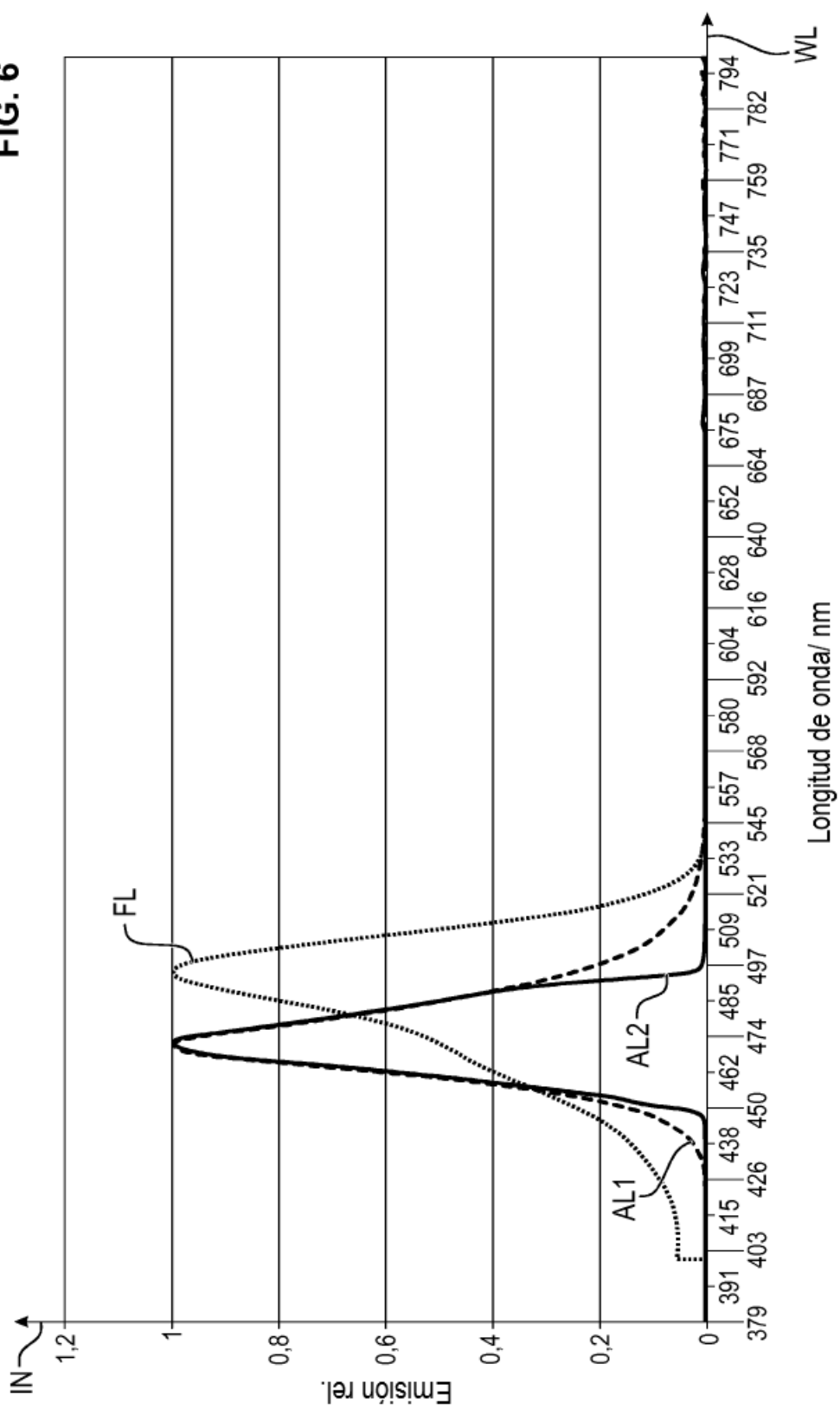
AM RM RM2 AM AM AM AM



AM RM RM2 AM AM AM AM

Fig.5b

FIG. 6



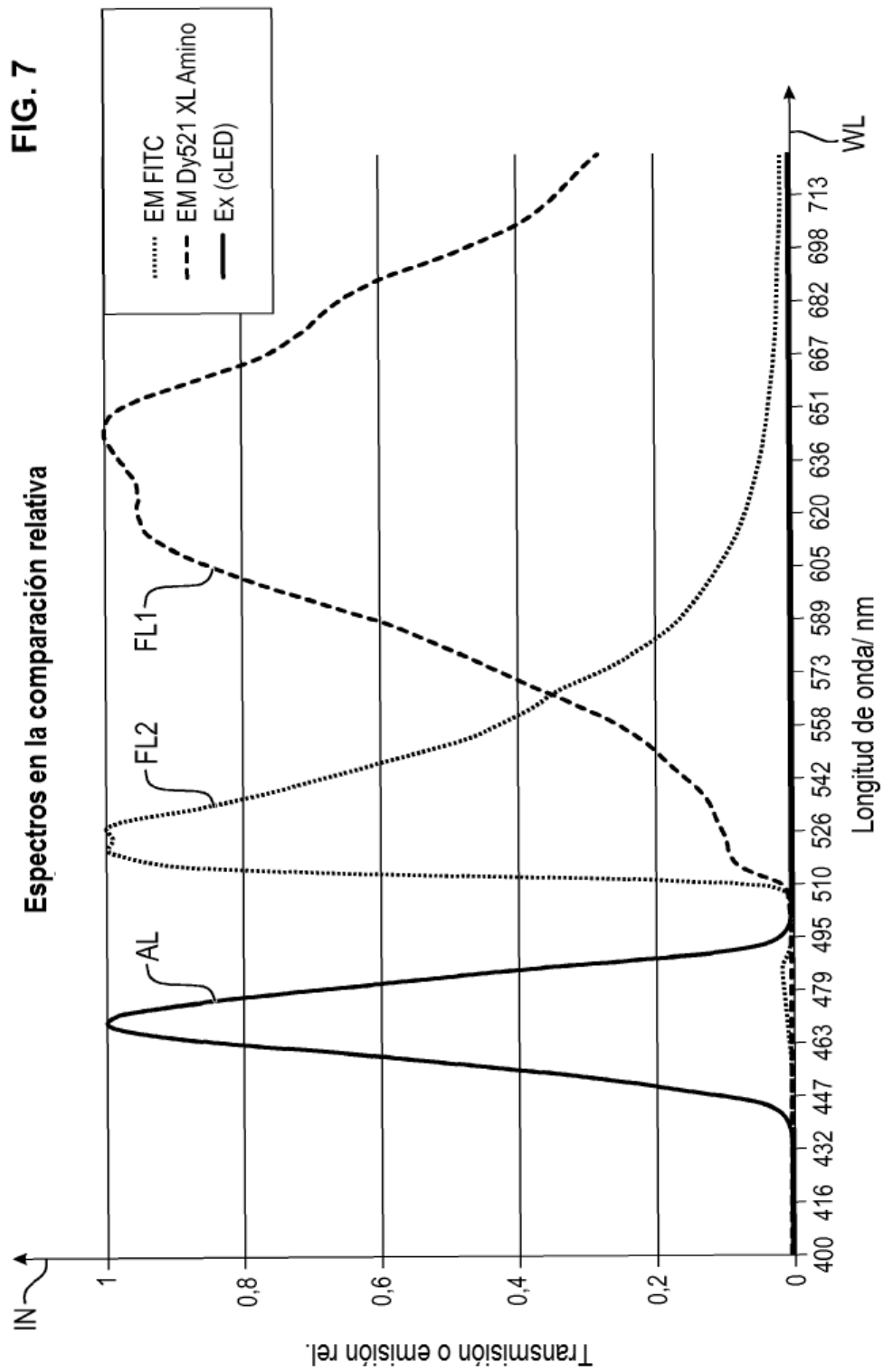


FIG. 8

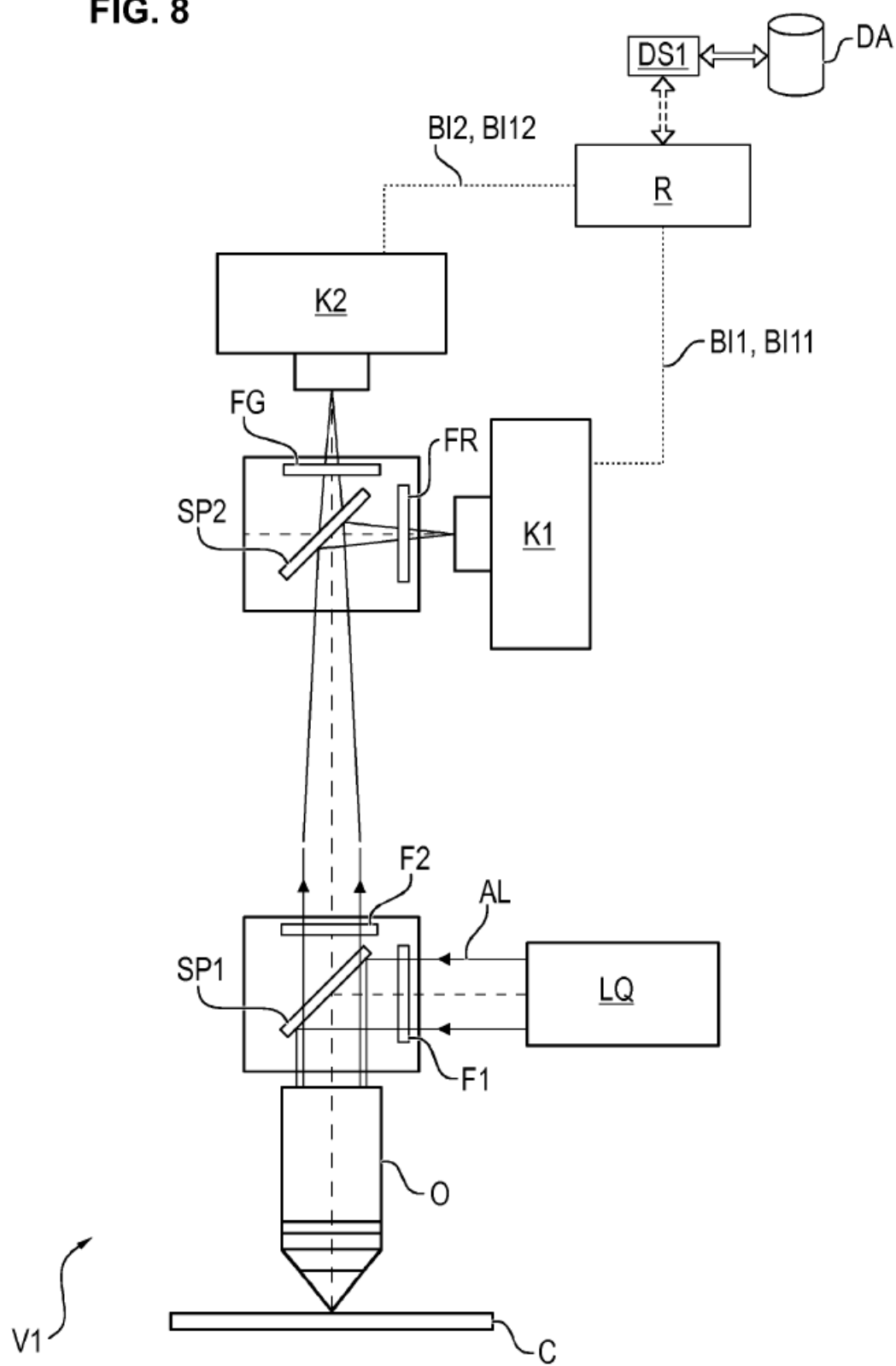


FIG. 9

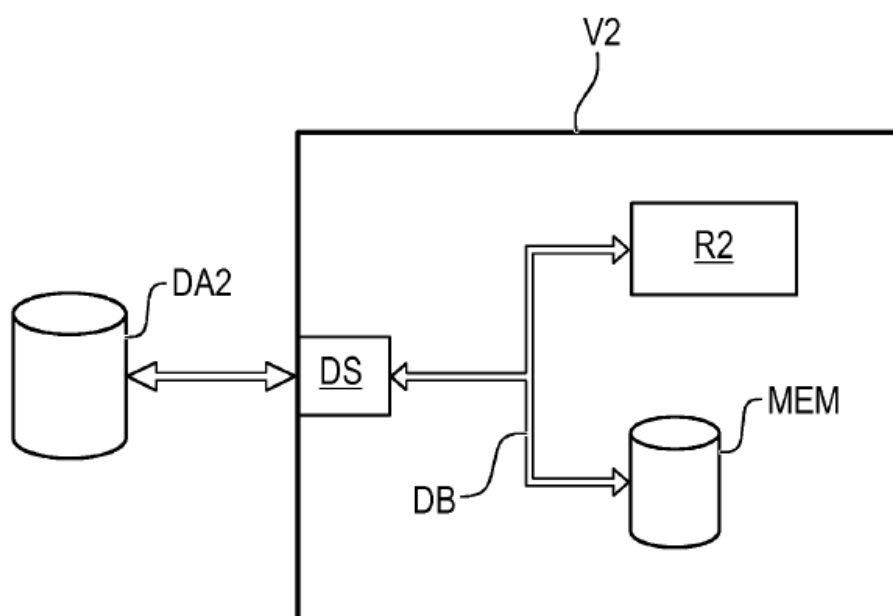


FIG. 10

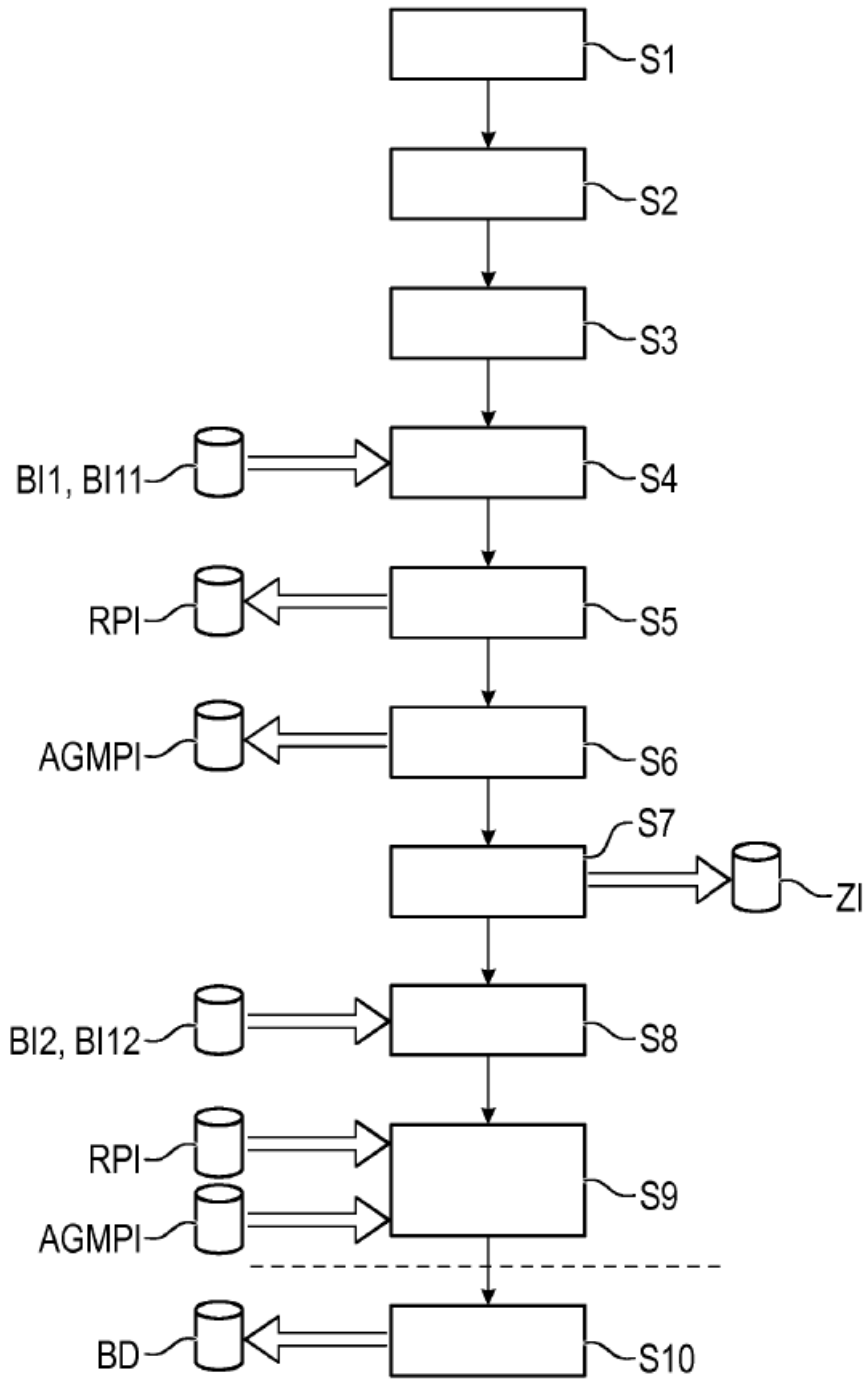


FIG. 11a

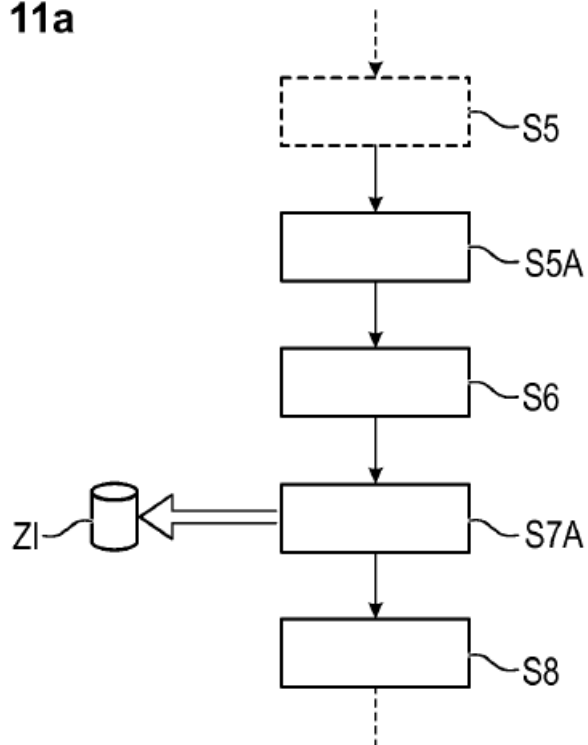


FIG. 11b

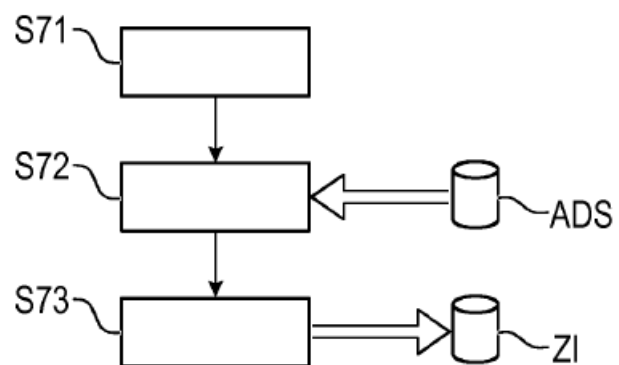


FIG. 11c

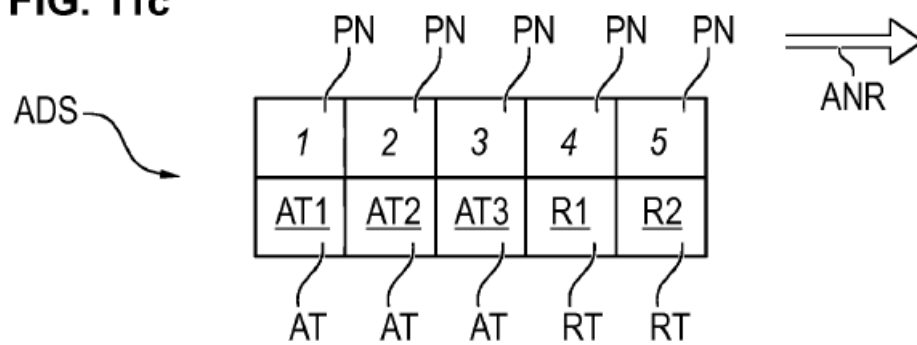


FIG. 12

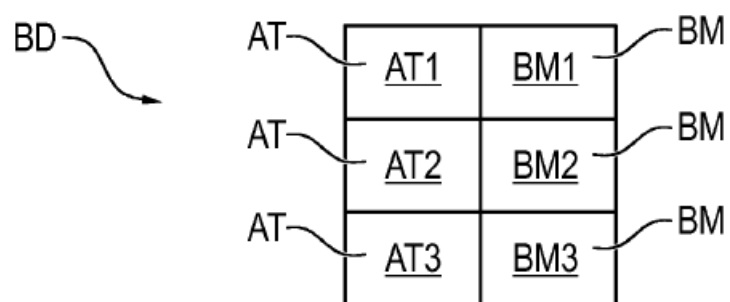


FIG. 13

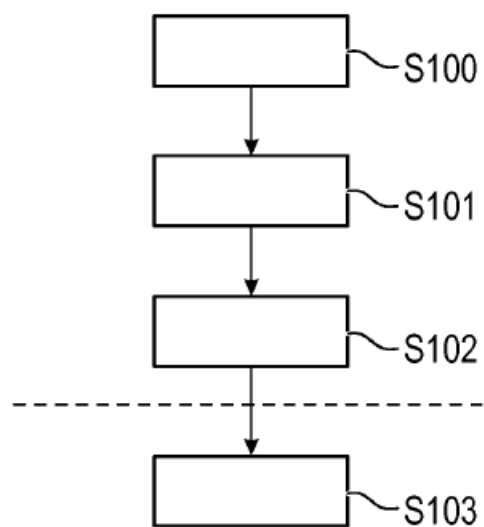


FIG. 14

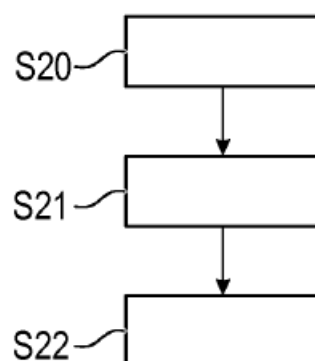


FIG. 15

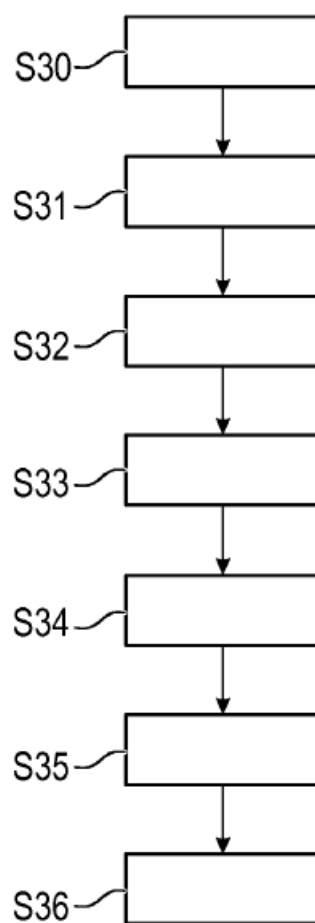


FIG. 16

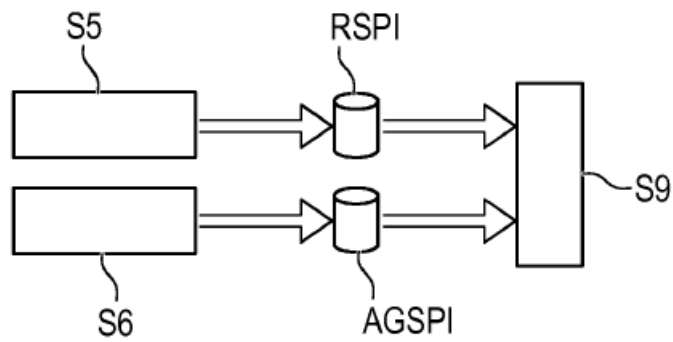


FIG. 17

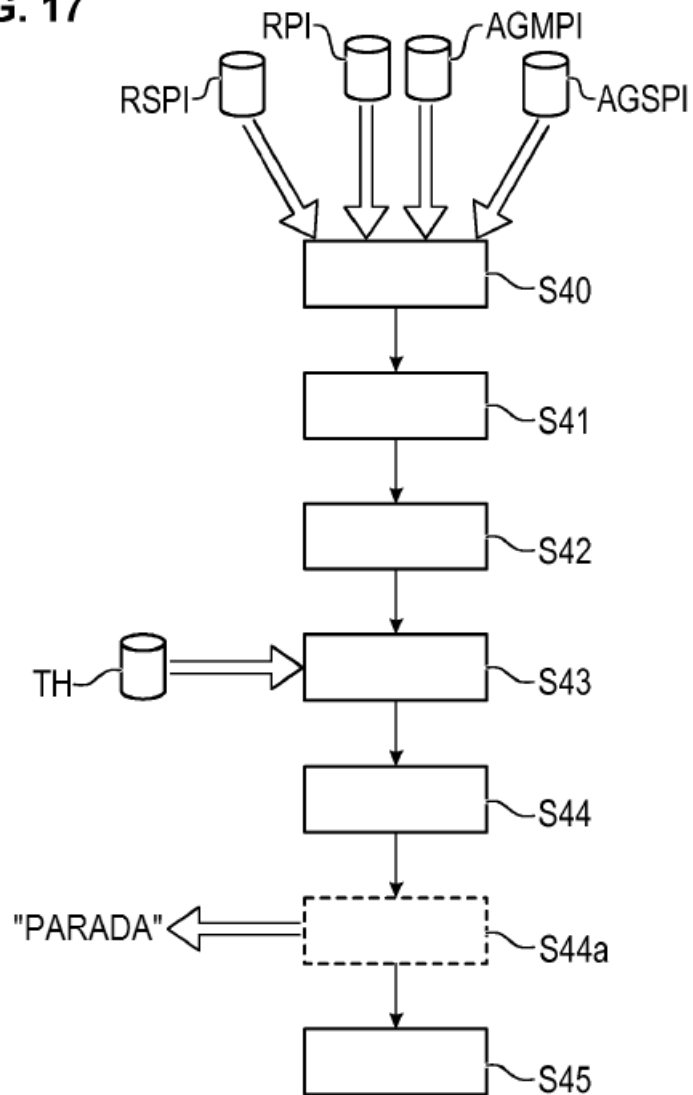


Fig. 18

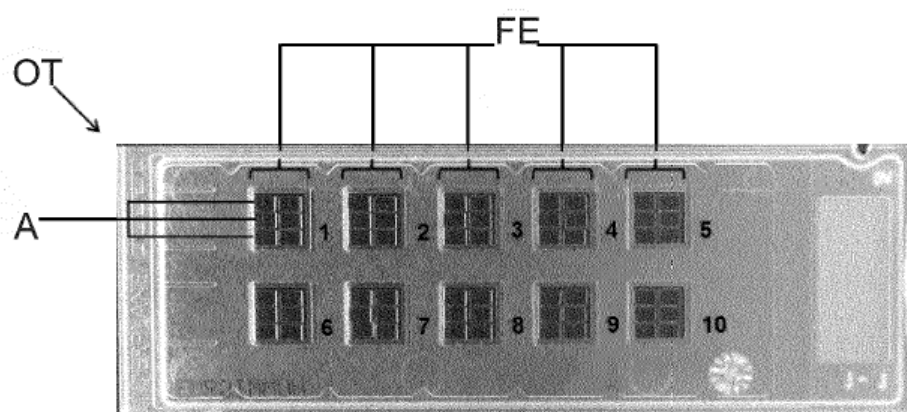


Fig. 19

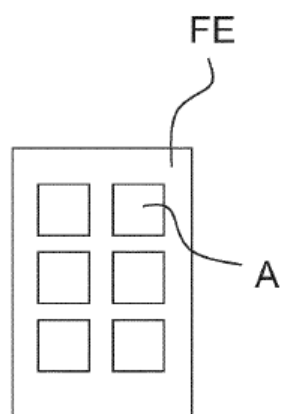


Fig. 20a

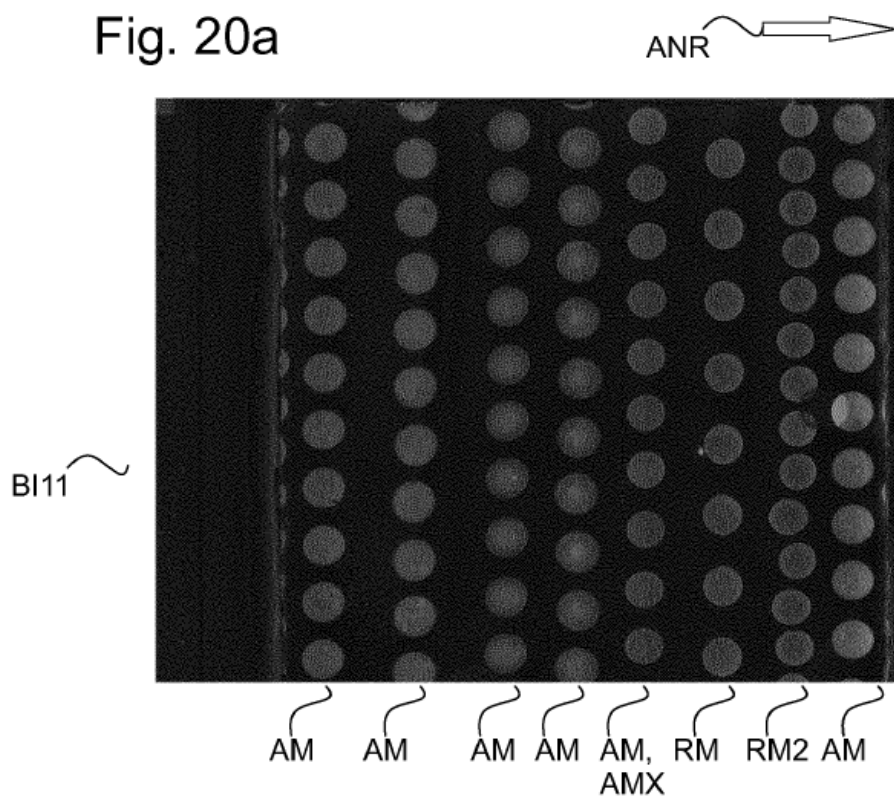


Fig. 20b

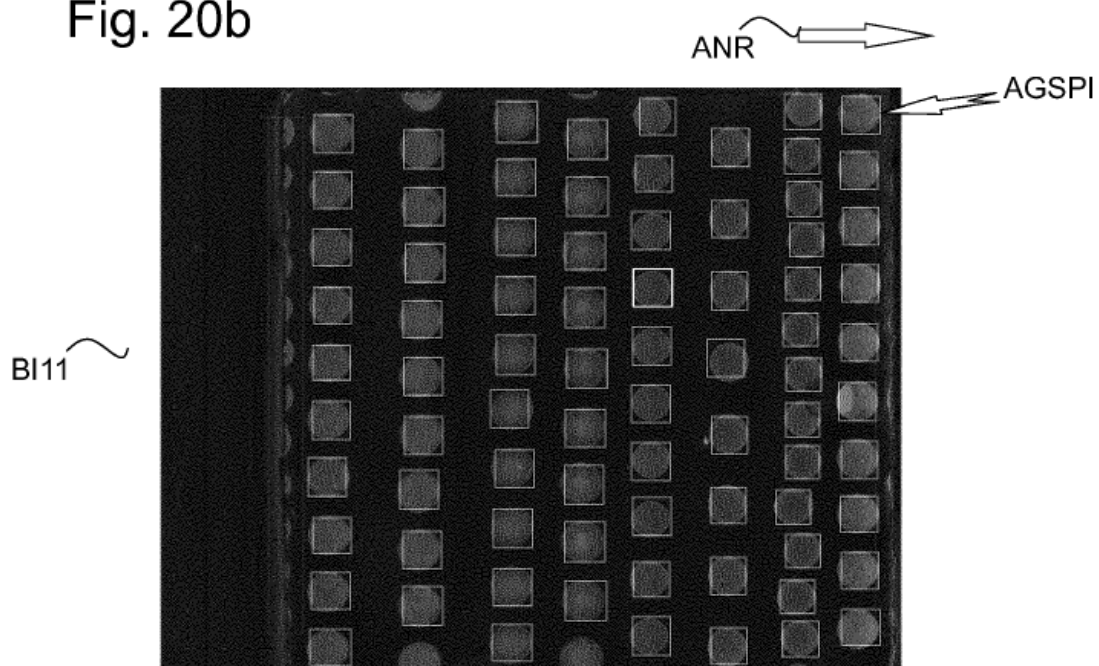


Fig. 21a

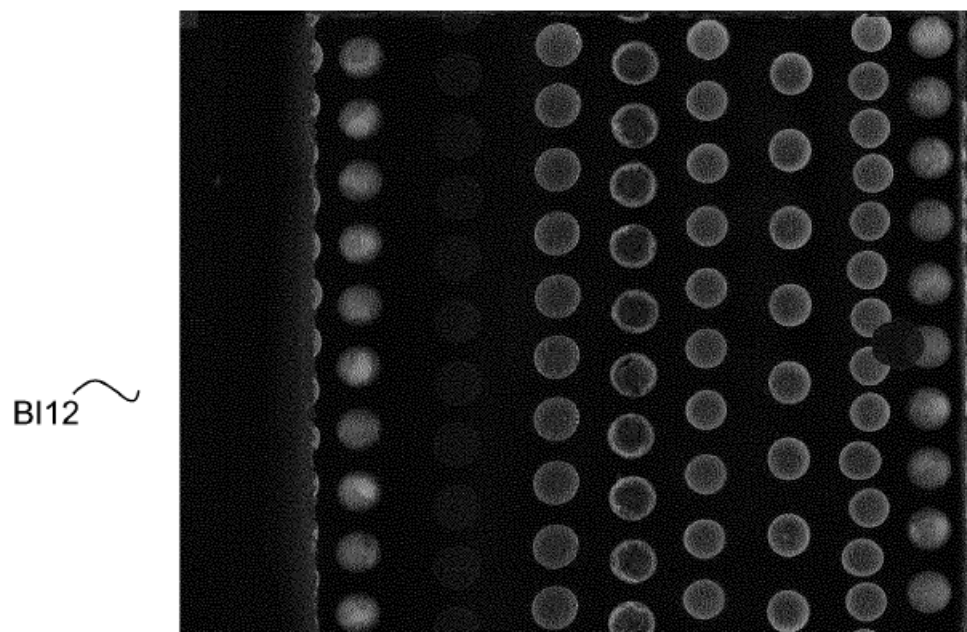


Fig. 21b

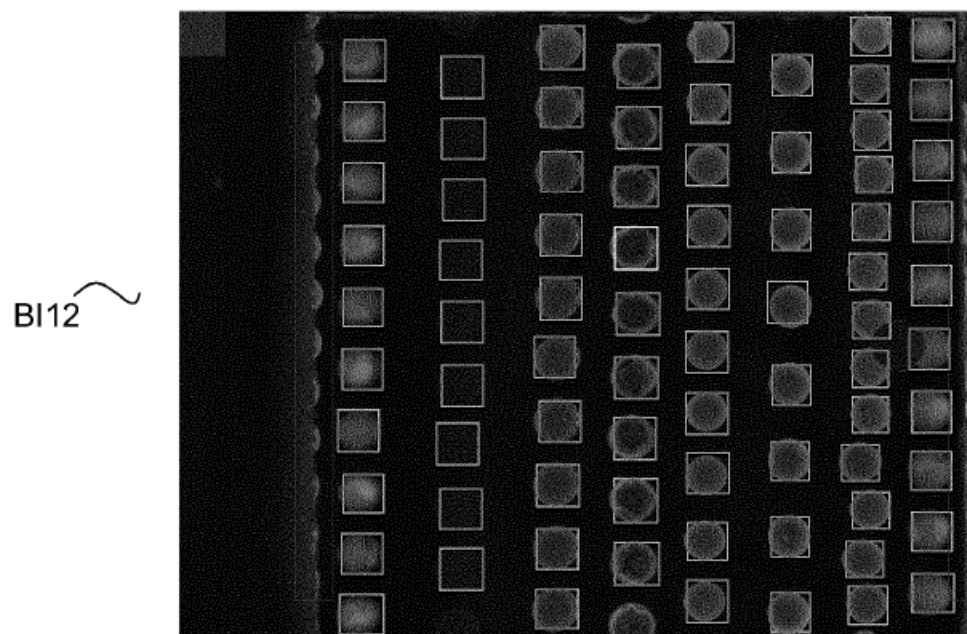


FIG. 22a

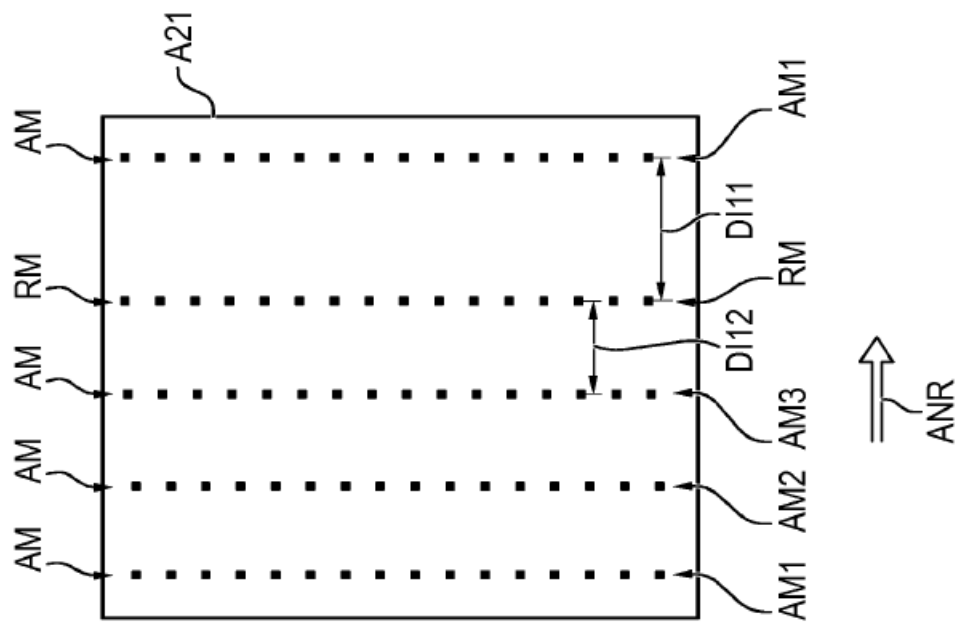


FIG. 22b

