

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 223/2004**

(22) Anmeldetag: **12.02.2004**

(43) Veröffentlicht am: **15.05.2006**

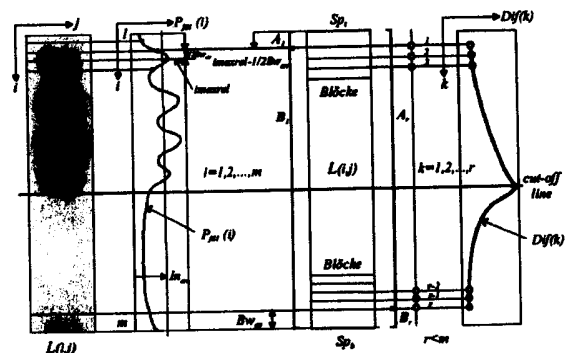
(51) Int. Cl.⁸: **G06T 7/40 (2006.01),
G01N 27/447 (2006.01)**

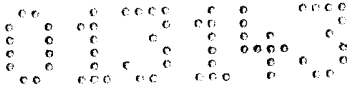
(73) Patentanmelder:

ARC SEIBERSDORF RESEARCH GMBH
A-1010 WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR ANALYSE VON BANDENBILDERN**

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auswertung von Bandbildern wobei zur Abgrenzung des Bandengebietes eine Cut-off-Linie ermittelt wird. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass zur Erstellung der Cut-off-Linie für jede Zeile ($i=1, 2, \dots, m$) des digitalen Spurbildes ($L(i,j)$) ein Intensitätswert ($P_{med}(i)$) berechnet wird,
- dass jedes Spurbild ($L(i,j)$) durch eine Teilung in zwei unmittelbar aufeinander folgende, sich in Spaltenrichtung erstreckende Blöcke (A_k, B_k) geteilt wird,
 - dass für alle Partitionen von für die der einen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke ermittelten Quotienten $Q_1(k)$ von den für die jeweils benachbarten, der anderen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke ermittelten Quotienten $Q_2(k)$ subtrahiert werden,
 - dass unter allen sich ergebenden absoluten Differenzwerten ($Dif(k)$) das globale Maximum (M) ermittelt wird und
 - dass die dieses Maximum (M) aufweisende Zeile der Teilung benachbarter Blöcke als Cut-Off-Linie des Bandengebietes der in dieser Bandenspur auszuwertenden Substanz angesehen wird.





12

~~12242~~

~~re: Österreichische Patentanmeldung A 229/2004~~
~~ARC Seibersdorf research GmbH~~

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auswertung von Bandbildern, wobei zur Abgrenzung des Bandengebietes eine Cut-off-Linie ermittelt wird.

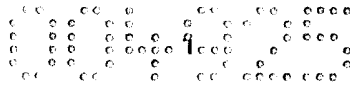
Erfindungsgemäß ist vorgesehen,

dass zur Erstellung der Cut-off-Linie für jede Zeile ($i=1, 2, \dots, m$) des digitalen Spurbildes ($L(i,j)$) ein Intensitätswert ($P_{med}(i)$) berechnet wird,

- dass jedes Spurbild ($L(i,j)$) durch eine Teilung in zwei unmittelbar aufeinanderfolgende, sich in Spaltenrichtung erstreckende Blöcke (A_k, B_k) geteilt wird,
- dass für alle Partitionen von für die der einen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke ermittelten Quotienten $Q_1(k)$ von den für die jeweils benachbarten, der anderen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke ermittelten Quotienten $Q_2(k)$ subtrahiert werden,
- dass unter allen sich ergebenden absoluten Differenzwerten ($Dif(k)$) das globale Maximum (M) ermittelt wird und
- dass die dieses Maximum (M) aufweisende Zeile der Teilung benachbarter Blöcke als Cut-Off-Linie des Bandengebietes der in dieser Bandenspur auszuwertenden Substanz angesehen wird.

< (Fig. 3) >

NACHGEREICHT



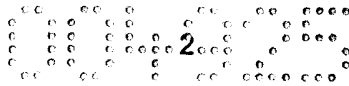
Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruches 1. Das erfindungsgemäße Verfahren kann vor allem zur Auswertung von Proben in Antidoping-Testlabors eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft vor allem ein Verfahren zur Korrektur von nichthomogenem Hintergrund in digitalen EPO (Erythropoietin)-Gelbildern und zur Berechnung einer "Cut-off-Linie" (Referenzlinie), die als Doping-Positivitätskriterium verwendet wird. Die zugrundeliegenden digitalen Gelbilder werden insbesondere mit Hilfe von isoelektrischer Elektrofokussierung (Elektrophorese) gewonnen und mit Bildaufnahme- und/oder Bildverarbeitungseinrichtungen erstellt. Die annähernd rechteckigen Bandenstrukturen befinden sich in vorzugsweise senkrecht verlaufenden Spuren des Bildes und sind überwiegend waagrecht ausgerichtet (ein typisches Beispiel für ein Protein-Gelbild ist in Fig.1 abgebildet). Das Bild veranschaulicht die angehäuften Ablagerungen von Glykoproteinformen auf der Basis von isoelektrischer Elektrofokussierung und "double blotting".

Peptidhormone wie EPO sind in Ausdauersportarten wie Langlauf oder Radsport aufgrund ihres leistungssteigernden Effekts und der schweren Nachweisbarkeit weit verbreitet. Das Hauptziel von rEPO (rekombinantes EPO)-Doping ist die Steigerung der Produktion roter Blutkörperchen, was zu erhöhter Sauerstofftransportkapazität des Blutes führt. Es können dadurch Leistungssteigerungen von bis zu 10 % erreicht werden. Während menschliches EPO - ein Glykoprotein - in den Nieren produziert wird, wird rEPO z.B. in Ovariumszellen von chinesischen Hamstern produziert.

Konventionelle Dopingsubstanzen wie anabole Steroide können mittels Gaschromatographie (GC) und Massenspektroskopie (MS) nachgewiesen werden. Es ist mit diesen Techniken jedoch nicht möglich, die Anwendung von rEPO nachzuweisen, da das Molekulargewicht von Glykoproteinen in einem Bereich liegt, der weit außerhalb des Bereichs von GC-MS liegt. Es wurde festgestellt, dass zur Detektion von rEPO isoelektrische Fokussierung (IEF) in Gels und die "double blotting" Methode, die die in Gelen enthaltenen Proteine in ein adäquateres Medium überträgt, geeignet sind. Durch Anwendung von chemiluminiszenten Reaktion wird ein endgültiges EPO Bild erzeugt (Fig.1). Die EPO-Dopingkontrolle hat zum Ziel, eine quantitative Charakteristik zu definieren und zu berechnen, die auf dem Vergleich der Positionen von Referenz-(Standard-) rEPO-Banden und den Banden in den Spuren von Urinproben von Sportlern in digitalen EPO-Gelbildern beruht.

In Fig.2 wird eine konventionelle Methode zur Berechnung der Referenz - "Cut-off-Linie" skizziert. Sie basiert auf der Verwendung von Standardgraphikwerkzeugen und einer manuellen Analyse. Auf der rechten Seite wird ein Profil der mittleren Zeilenintensitäten einer rEPO-Standardspur dargestellt. Der Benutzer sucht darin nach dem lokalen Maximum P_1 , das der sauersten Bande der rEPO-Standardspur entspricht. Danach wird das Tal V_1 zwischen P_1 und dem nächsten lokalen Maximum in basischer



Richtung gesucht und die Distanz $P_1 V_1 = \delta$ gemessen. Die Position der Cut-off-Linie wird schließlich als die Position definiert, die durch die Distanz δ von P_1 aus in entgegengesetzter Richtung zum Tal V_1 gegeben ist.

Ziel der Erfindung ist es vor allem, eine exakte Erstellung einer Cut-off-Linie mit geringem Rechenaufwand zu erreichen und Banden unterschiedlicher Substanzen eindeutig trennen zu können.

Diese Ziele werden bei einem Verfahren der eingangs genannten Art mit den im Kennzeichen des Patentanspruches 1 angegebenen Merkmalen erreicht.

Die Exaktheit der Vorgangsweise wird erhöht bzw. die Rechenzeit wird herabgesetzt, wenn gemäß der Merkmalen des Anspruches 4 vorgegangen wird. Um die Spurbilder in eine definierte Ausgangslage für die Auswertung bringen zu können, sind die Merkmale des Anspruches 6 von Vorteil. Zur Abgrenzung von Spurbildern unterschiedlicher Stoffe wird vorteilhaft gemäß den Merkmalen des Anspruches 7 vorgegangen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der Zeichnungen näher erklärt:

Fig.3 zeigt schematisch die Auswertung eines Spurbildes. Fig.4 zeigt schematisch die Bildung der Intensitätsvariabilität und der absoluten Differenzen. Fig.5 zeigt schematisch die Trennung von in einem Spurbild enthaltenen Banden von zwei unterschiedlichen Substanzen. Fig.6 zeigt schematisch ein Flussdiagramm des Verfahrens.

Im Folgenden wird die Berechnung einer Cut-off-Linie für ein rEPO-Spurbild erläutert.

Es wird für jede Zeile des in digitaler Form vorliegenden Spurbildes ein einziger Intensitätswert $P_{med}(i)$ ermittelt.

Um ein Bildrauschen zu unterdrücken, wird vorteilhaft ein 1D Medianprofil (Spaltenvektor) $P_{med}(i)$ des gegebenen digitalen Standard-2D-Spurbildes $L(i,j)$ für alle Zeilen $i=1,2,\dots,m$ anhand folgender Formel errechnet:

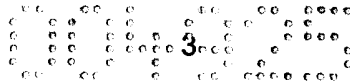
$$P_{med}(i) = \text{median}\{L(i,j): j=1,2,\dots,n\},$$

wobei j die Spaltenindizes darstellt. Das bedeutet, dass der Median einer gegebenen Zeile i in n Intensitätswerten dieser Zeile des Spurbildes gefunden wird. Anstelle einer Medianbildung könnte eine andere Mittelwertbildung oder Wichtung der Intensitätswerte der Bildpunkt einer Zeile vorgenommen werden.

Um irrelevante lokale Maxima des Medianprofils zu reduzieren, kann es durch einen Meanfilter geglättet werden. In Konvolutionsnotation wird das gefilterte Medianprofil $P_{fil}(i)$ durch

$$P_{fil}(i) = P_{med}(i) \otimes f(i)$$

ausgedrückt, wobei $f(i)$ den Konvolutionskern des Meanfilters darstellt.



Im Folgenden wird eine Menge $\{(A_k B_k)\}$ aller möglichen Partitionen des Spurbildes $L(i,j)$ in benachbarte rechteckige Blöcke $A_k B_k$, $k = 1, 2, \dots, r$ konstruiert (Fig.3)

Jeder Bildblock A_k wird in kontinuierlicher Notation (für reelle Variable x anstatt ganzzahlige Indizes i) durch ein Gesamtmaß $m_t(A_k)$ der Intensitätsvariabilität innerhalb des Blockes charakterisiert:

$$m_t(A_k) = \frac{1}{a_k - a} \int_a^{a_k} \left| \frac{dP_{full}(x)}{dx} \right| dx$$

Jeder Bildblock B_k wird in kontinuierlicher Notation durch eine Gesamtmaß $m_b(B_k)$ der Intensitätsvariabilität innerhalb des Blockes charakterisiert:

$$m_b(B_k) = \frac{1}{b - a_k} \int_{a_k}^b \left| \frac{dP_{full}(x)}{dx} \right| dx$$

Wie in Fig.4 dargestellt, ist es möglich, dass basierend auf dem Vektor der Intensitätswerte $P_{full}(i)$ für die jeweils benachbarten Blöcke die jeweilige integrale Intensitätsvariabilität $m_t(A_k)$, $m_b(B_k)$, insbesondere für den oberen Block die Intensitätsvariabilität $m_t(A_k)$ und für den unteren Block die Intensitätsvariabilität $m_b(B_k)$ ermittelt wird. Insbesondere kann für diese Blöcke über alle Zeilen die Summe der Absolutwerte der Differenzen der Intensitätswerte $P_{full}(i)$ von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Zeilen ermittelt werden.

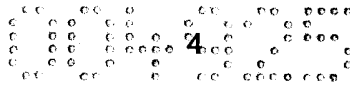
Für alle möglichen Positionen k der Trennungslinie zwischen zwei benachbarten Blöcken A_k , B_k werden zwei Funktionen definiert: nämlich eine Funktion topdown, die durch die Werte der Intensitätsvariabilität $m_t(A_k)$ der Blöcke A_1, A_2, \dots, A_r , gegeben ist, und ferner eine Funktion bottomup, die durch die Werte der Intensitätsvariabilität $m_b(B_k)$ der Blöcke B_1, B_2, \dots, B_r gegeben ist.

Es ist vorteilhaft, wenn die für die jeweiligen Blöcke ermittelte integrale Intensitätsvariabilität normiert wird, vorzugsweise indem die erhaltene Summe durch die gegebenenfalls um 1 verringerte Zeilenanzahl des jeweiligen Blockes dividiert wird.

Schließlich wird für die diskrete Version dieser zwei Funktionen eine Differenzfunktion folgendermaßen definiert:

$$Dif(k) = | Q_1(k) - Q_2(k) |.$$

Dazu kann vorgesehen sein, dass der Reihe nach die für die der einen Spurgrenze näher gelegene Blöcke, insbesondere die oberen Blöcke, ermittelten Quotienten $Q_1(k)$ von den für die benachbarten, der anderen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke,



insbesondere die unteren Blöcke, ermittelten Quotienten $Q_2(k)$ subtrahiert und die Absolutwerte der Differenzen gebildet werden.

Es wird eine Suche nach dem globalen Maximum dieser Funktion $Dif(k)$ durchgeführt. Der Zeilenindex dieses Maximums repräsentiert ein Paar von benachbarten Bildblöcken, für die die Differenz ihrer Intensitätsvariabilität am größten ist. Dieser Zeilenindex wird als der Zeilenindex der Cut-off-Linie angesehen.

Anhand der Fig.4 wird die Ermittlung der Differenz der Intensitätsvariabilität anhand eines Zahlenbeispiels dargestellt. Das Profil $P_{fil}(i)$, das in Fig.4 oben dargestellt ist, wird für die einzelnen Zeilen ermittelt, indem die Intensitäten der digitalen Bildpunkte gemittelt werden, insbesondere wird eine Medianbildung vorgenommen. Für die einzelnen Zeilen besitzt das gefilterte Medianprofil $P_{fil}(i)$ beispielsweise die in Form eines Vektors angeführten Zahlen.

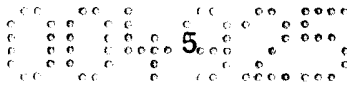
Dieser Spaltenvektor wird in die den Blöcken A_k und B_k des jeweiligen Spurbildes $(L(i,j))$ entsprechende Teile aufgeteilt; dargestellt ist eine Aufteilung, bei der Block A_k vier Zeilen (Block A_3) und der zugehörige Block B_k 16 Zeilen (Block B_3) besitzt.

Im nächsten Schritt werden für die einzelnen Blöcke die Absolutwerte der Differenzen der gefilterten Medianwerte der einzelnen Zeilen gebildet.

Es erfolgt eine Summierung der Absolutwerte der Differenzen jeweils für die beiden Blöcke A_3 und B_3 und eine Quotientenbildung, in dem die für die einzelnen Blöcke ermittelte Summe um die um 1 verminderte Zeilenanzahl dividiert wird. Man erhält die Quotienten $Q_1(k)$ und $Q_2(k)$ bzw. $Q_1(3)$ und $Q_2(3)$.

In Folge wird die absolute Differenz $Dif(3)$ dieser beiden Quotienten ermittelt; diese Ermittlung der Quotienten erfolgt für jede Partition des Spaltenvektors $P_{fil}(i)$, so dass ein Differenzvektor $Dif(k)$ erhalten wird. Das Maximum dieses Differenzvektors bestimmt die Lage der Cut-off-Linie.

Das generelle Schema der Berechnung der Intensitätsvariabilität innerhalb der Paare benachbarter Bildblöcke eines Spurbildes $L(i,j)$ wird vorteilhafterweise modifiziert, da nicht alle Blöcke gleich relevant sind. Ein Teil der Blöcke wird zweckmäßigerweise aufgrund ungenügender Information (zu geringe Anzahl von Zeilen) bzw. aufgrund des Vorabwissens über die Bandbreite in EPO Bildern ausgeschlossen. Die durchschnittliche Bandbreite Bw_{av} (empirischer Wert in Anzahl von Pixel bzw. Zeilen) auf dem Niveau eines vorgegebenen oder berechneten durchschnittlichen Schwellwertes In_{av} wird dazu ermittelt. Im gefilterten Medianprofil $P_{fil}(i)$ wird das erste lokale Maximum ($imaxrel$) von oben bzw. dessen Zeilenindex ermittelt, das größer ist als der Schwellwert In_{av} . Es wird sodann der erste relevante Bildblock A_i als folgendes Teilbild des Spurbildes definiert:



$$A_l(i,j) = \{L(i,j): i=1,2,\dots,(imaxrel - \frac{1}{2}Bw_{av}), j=1,2,\dots,n\}$$

In ähnlicher Vorgangsweise wird der letzte Bildblock B_r anhand der Information über die durchschnittliche Bandenbreite in EPO Bildern folgendermaßen definiert:

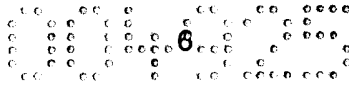
$$B_r(i,j) = \{L(i,j): i= m - Bw_{av}, \dots, m, j=1,2,\dots,n\}.$$

Es ist somit vorgesehen, dass zur Bestimmung der inneren Grenze des ersten Blockes A_l mit der geringsten Zeilenanzahl, das Maximum des Verlaufs der Intensitätswerte $P_{fill}(i,j)$ ermittelt wird, das den geringsten Abstand von einer der beiden, insbesondere der oberen, Spurgrenze Sp_t aufweist und einen vorgegebenen Schwellenwert In_{av} , insbesondere den Durchschnitts- bzw. Mittelwert der Intensitätswerte $P_{med}(i,)$ überschreitet. Ferner wird von dem Zeilenindex ($imaxrel$) dieses Maximums ein vorgegebener Wert, insbesondere die Hälfte der Zeilenzahl der durchschnittlichen Bandbreite Bw_{av} abgezogen und der sich ergebende Zeilenindex als innere Grenze des ersten Blockes A_l angesehen. Zur Bestimmung der inneren Grenze des letzten Blockes A_r mit der höchsten Zeilenanzahl r wird die vorhandene Spurgrenze um eine Zeilenanzahl entsprechend der durchschnittliche Bandbreite Bw_{av} in Richtung in das Innere des Spurbildes verlegt und als innere Grenze des letzten Blockes A_r angesehen.

Diese ermittelten Grenzen für die Blöcke mit Mindestzeilenanzahl werden der Teilung des Spurbildes $L(i,j)$ zugrundegelegt. Die Zeilenzahl der zu den Blöcke A_r konjugierten Blöcken B_r ergibt sich, da die Summe der Zeilen der Blöcke A_r und der Blöcke B_r der Gesamtzeilenanzahl eines Spurbildes mit den Grenzen Sp_t und Sp_b entspricht.

Die Auswertung einer NESP Standardspur, bei der die Banden im unteren, d.h. dem Bereich eines rEPO-Bildes gegenüberliegenden, Bereich des Spurbildes konzentriert sind, unterscheidet sich von der Auswertung einer rEPO-Standardspur durch zwei zusätzliche Schritte: Zuerst muss das Spurbild vor der Anwendung eines für rEPO-Auswertung zugeschnittenen Verfahrens über eine Zeile bzw. horizontale Achse gespiegelt werden. Dadurch wird ein temporäres Spurbild erhalten, in dem die Banden im oberen Bereich konzentriert sind, was für EPO-Standardspuren charakteristisch und üblich ist. Anschließend wird auf dieses geometrisch transformierte Spurbild die zuvor beschriebene Vorgangsweise angewendet. Schließlich wird der so erhaltene Zeilenindex der Cut-off-Line in das ursprüngliche Koordinatensystem des Eingangsbildes zurückgerechnet. Prinzipiell ist das erfindungsgemäße Verfahren in gleicher Weise auf rEPO und NESP Spurbilder anwendbar, z.B. könnte ein NESP Spurbild in seiner Bildebene um 180° verdreht der Auswertung zugrundegelegt werden.

Beim Vorliegen einer kombinierten rEPO+NESP-Standardspur in einem Spurbild sind zwei Cut-off-Lines zu berechnen; eine rEPO Cut-off-Line für den Teil der Spur, in



dem rEPO Proteine konzentriert sind, und eine NESP Cut-off-Line für den Teil, in dem NESP Proteine konzentriert sind.

Bei Vorliegen von Spurbildern, die Bandenbereiche unterschiedlicher Substanzen oder Stoffe, insbesondere von rEPO und NESP, enthalten wird zur Trennung der Bandenbereiche der unterschiedlichen Substanzen oder Stoffe für jede Zeile des Spurbildes ein Intensitätswert $P_{med}(i)$ ermittelt, z.B. durch Mittelwertbildung, gewichtete Mitteilung, Summierung oder Medianbildung der bzw. für die Intensitätswerte der einzelnen digitalen Bildpunkte dieser Zeile. Für ein kombiniertes rEPO+NESP 2D Spurbild $L(i,j)$ wird somit zuerst, wie auch bei der oben beschriebenen Vorgangsweise ein 1D Medianprofil $P_{med}(i)$ berechnet.

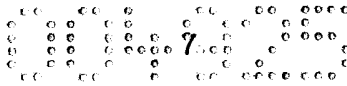
Das Medianprofil $P_{med}(i)$ kann sodann mit einem Meanfilter mit einer großen Fenstergröße win (ca. 10% der Spurbildhöhe, in üblichen EPO Spurbildern ca. 30 Pixel) gefiltert werden. Vorteilhaft ist es dabei, wenn zur Filterung des Profils $P_{med}(i)$ der Intensitätswerte der einzelnen Zeilen eine Mittelwertbildung der Intensitätswerte über eine 6 bis 14 %, vorzugsweise 8 bis 12 %, der Zeilenanzahl des gesamten Spurbildes betragende Anzahl von, insbesondere symmetrisch, beidseits der jeweils betrachteten Zeile liegenden Zeilen erfolgt und dieser Wert der betrachteten Zeile als Intensitätswert zugeordnet wird.

In dem resultierenden gefilterten Medianprofil $P_{filz}(i)$ wird nach dem globalen Maximum Max_1 und dem zweithöchsten Maximum Max_2 gesucht. Zwischen Max_1 und Max_2 wird nach dem globalen Minimum min gesucht. Beim Zeilenindex (Koordinate) d dieses Minimums wird das Eingangsspurbild in zwei temporäre Teilbilder $L_a(i,j)$ und $L_b(i,j)$ geteilt (Fig.5). Die diesen zwei Teilbildern entsprechenden gefilterten partiellen Medianprofile $PT_{fil}(i)$ (für oberes Teilbild) und $PB_{fil}(i)$ (für unteres Teilbild) sind Teilmengen des ursprünglichen gefilterten Medianprofils $P_{fil}(i)$. Ferner wird der durchschnittliche Intensitätswert (Schwellwert) In_{av} des gesamten Spurbildes berechnet.

Im partiellen gefilterten Medianprofil $PT_{fil}(i)$ wird nach dem ersten lokalen Maximum von unten gesucht, dessen Wert höher ist als der Schwellwert In_{av} . Der Index dieses Maximums T_{nsp} dient als obere Begrenzung des NESP Teilbildes $L_{nsp}(i,j)$, das folgendermaßen definiert wird:

$$L_{nsp}(i,j) = \{ L(i,j): i \in \{ T_{nsp} + \frac{1}{2} Bw_{av}, \dots, m \} \} .$$

Im partiellen gefilterten Medianprofil $PB_{fil}(i)$ wird nach dem ersten lokalen Maximum von oben gesucht, dessen Wert höher als der Schwellwert In_{av} ist. Der Index dieses Maximums B_{epo} dient als untere Begrenzung des rEPO Teilbildes $L_{epo}(i,j)$, das folgendermaßen definiert wird:



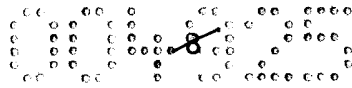
$$L_{epo}(i,j) = \{ L(i,j): i \in \{1, \dots, B_{epo} - 1/2 B_{w_{av}}\} \}.$$

Auf das rEPO Teilbild $L_{epo}(i,j)$ wird die zuvor für ein rEPO-Bild beschriebene Vorgangsweise mit dem Ziel angewendet, die rEPO Cut-off-Line für das kombinierte Spurbild zu ermitteln.

Auf das NESP Teilbild $L_{nsp}(i,j)$ wird die zuvor für ein NESP-Bild beschriebene Vorgangsweise mit dem Ziel angewendet, die Cut-off-Line für das NESP Teilbild zu ermitteln. Diese Cut-off-Line wird in das ursprüngliche Koordinatensystem des kombinierten Spurbildes zurückgerechnet und ergibt damit die endgültige NESP Cut-off-Line des kombinierten Spurbildes.

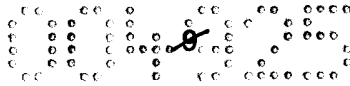
Ganz allgemein ist es zweckmäßig, wenn vor der Bestimmung der Cut-off-Linie zur Entfernung von Rausch ein Rauschfilter, vorzugsweise ein auf einer geometrisch gesteuerten Diffusion (GDD) basierender Rauschfilter, angewendet wird. Es ist außerdem zweckmäßig, wenn vor der Bestimmung der Cut-off-Linie eine Bildkorrektur, z.B. durch Entzerren, Verschieben und/oder Größenänderung, des Intensitätsbildes bzw. der Bildmatrix vorgenommen wird.

Fig.5 zeigt in Form eines Flussdiagramms schematisch die Vorgangsweise bei der Auswertung von rEPO-Spurbildern, NESP-Spurbildern und kombinierten rEPO + NESP-Spurbildern.

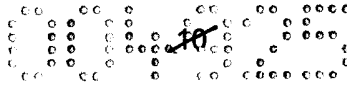


Patentansprüche:

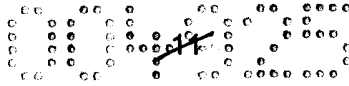
1. Verfahren zur Analyse und/oder Auswertung von, insbesondere in Form von Gelbildern vorliegenden, Bandenbildern von zumindest einer(m), vorzugsweise organischen, Substanz und/oder Stoff, vorzugsweise natürlichen und/oder synthetischen Proteinen, insbesondere EPO und/oder rEPO und/oder NESP, welche Bandenbilder durch Elektrophorese, vorzugsweise isoelektrische Elektrofokussierung, gewonnen und mit Bildaufnahme- und Bildverarbeitungseinrichtungen ausgewertet werden, wobei zur Abgrenzung des Bandengebietes in einem die Banden der(s) jeweiligen Substanz oder Stoffes in einer Spur enthaltenden Spurbild eine Cut-off-Linie bzw. Grenzlinie ermittelt bzw. berechnet und danach die Auswertung des Spurbildes bzw. der Bandenbilder fortgesetzt wird, dadurch gekennzeichnet,
 - dass zur Erstellung der Cut-off-Linie für jede Zeile ($i=1, 2, \dots, m$) des digitalen Spurbildes ($L(i,j)$) ein Intensitätswert ($P_{med}(i)$) berechnet bzw. ermittelt wird, z.B. durch Mittelwertbildung, gewichtete Mittelung, Summierung oder Medianbildung der bzw. für die Intensitätswerte der einzelnen digitalen Bildpunkte in den Spalten ($j=1, 2, \dots, n$) dieser Zeile,
 - dass jedes Spurbild ($L(i,j)$) innerhalb seiner, gegebenenfalls ausgewählten bzw. vorgegebenen, Spurgrenzen (Sp_i, Sp_b) durch eine parallel zu einer Zeile erfolgenden Teilung in zwei unmittelbar aufeinanderfolgende, sich in Spaltenrichtung erstreckende Blöcke (A_k, B_k) geteilt wird, wobei alle möglichen Partitionen ($k=1, 2, \dots, r$) des der Teilung unterzogenen Spurbildes $L(i,j)$ in zwei benachbarte Blöcke (A_k, B_k), insbesondere in einen oberen Block (A_k) und einen unteren Block (B_k), ermittelt werden,
 - dass basierend auf dem Vektor der Intensitätswerte ($P_{med}(i)$) für die benachbarten Blöcke die jeweilige integrale Intensitätsvariabilität ($m_i(A_k), m_b(B_k)$), insbesondere für den oberen Block die Intensitätsvariabilität ($m_i(A_k)$) und vorzugsweise für den unteren Block die Intensitätsvariabilität ($m_b(B_k)$), ermittelt wird, insbesondere für diese Blöcke über alle Zeilen die Summe der Absolutwerte der Differenzen der Intensitätswerte ($P_{med}(i)$) von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Zeilen ermittelt wird,
 - dass die für die jeweiligen Blöcke ermittelte integrale Intensitätsvariabilität normiert wird, vorzugsweise indem die erhaltene Summe durch die gegebenenfalls um 1 verringerte Zeilenanzahl des jeweiligen Blockes dividiert wird,
 - dass der Reihe nach bzw. für alle Partitionen die für die der einen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke, insbesondere die oberen Blöcke, ermittelten Quotienten $Q_1(k)$ von den für die jeweils benachbarten, der anderen Spurgrenze näher gelegenen Blöcke, insbesondere die unteren Blöcke, ermittelten Quotienten $Q_2(k)$ subtrahiert werden,



- dass unter allen sich ergebenden absoluten Differenzwerten ($Dif(k)$) das globale Maximum (M) ermittelt wird und
 - dass die dieses Maximum (M) aufweisende Zeile der Teilung benachbarter Blöcke als Cut-Off-Linie bzw. Grenzlinie des Bandengebietes der(s) in dieser Bandenspur auszuwertenden Substanz bzw. des Stoffes angesehen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass nach Ermittlung der Intensitätswerte und vor Teilung des Spurbildes in Blöcke, der Vektor der für die einzelnen aufeinanderfolgenden Zeilen ermittelten Intensitätswerte $P_{med}(i)$ einer Konvolution unterzogen wird, insbesondere dass für die einzelnen Zeilen ein gegebenenfalls gewichteter Mittelwert ermittelt wird, indem die Intensitätswerte einer vorgegebenen Anzahl von aufeinander folgenden, insbesondere symmetrisch zu dieser Zeile gelegenen Zeilen, gewichtet gemittelt werden und der erhaltene Wert $P_{full}(i)$ anstelle des Intensitätswertes dieser Zeile gesetzt und der weiteren Auswertung zugrundegelegt wird.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zur Berechnung der Intensitätsvariabilität bzw. der Summe nur Blöcke mit einer vorgegebenen Mindestzeilenanzahl herangezogen werden.
 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
 - dass zur Bestimmung der inneren Grenze des ersten Blockes (A_l) der Partition mit der geringsten Zeilenanzahl, das Maximum des Verlaufs bzw. Profils ($P_{full}(i)$) der gegebenenfalls konvolvierten Intensitätswerte ermittelt wird, das den geringsten Abstand von einer der beiden außenliegenden Spurgrenzen (Sp_b , Sp_b), insbesondere der oberen Spurgrenze (Sp_l), aufweist und einen vorgegebenen Schwellenwert (In_{av}), insbesondere den Durchschnitts- bzw. Mittelwert der Intensitätswerte ($P_{med}(i)$), überschreitet,
 - dass von dem Zeilenindex ($imaxrel$) dieses Maximums ein vorgegebener Wert, insbesondere die der Hälfte der mittleren Breite (Bw_{av}) aller Maxima auf dem Niveau des Schwellenwertes (In_{av}) entsprechende Zeilenanzahl, abgezogen wird und der sich ergebende Zeilenindex die innere Grenze des ersten Blockes (A_l) bestimmt,
 - dass zur Bestimmung der inneren Grenze des letzten Blockes (A_r) mit der höchsten Zeilenanzahl der Zeilenindex der vorgegebenen bzw. vorhandene, insbesondere unteren, Spurgrenze (Sp_b) um eine Zeilenanzahl entsprechend der mittleren Breite (Bw_{av}) verringert bzw. die Zeile der Spurgrenze (Sp_b) in Richtung in das Innere des Spurbildes verlegt und die erhaltene Zeile als innere Grenze des letzten Blockes (A_r) angesehen wird, und



- dass diese ermittelten Grenzen zur Festlegung der Mindestzeilenanzahl der der Teilung des Spurbildes ($L(i,j)$) zugrundegelegten Blöcke herangezogen werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das digitale Bild vor Ermittlung der Intensitätswerte einer Bildkorrektur, z.B. durch ein Entzerren, Verschieben und/oder Größenänderung der Bildmatrix, allenfalls begleitet von einer Rauschunterdrückung vorgenommen wird.
 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass vor Ermittlung der Intensitätswerte das Spurbild, insbesondere ein NESP-Spurbild, geometrisch invertiert bzw. parallel zum Zeilenverlauf gespiegelt wird, woraufhin die Cut-Off-Linie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 ermittelt und zur weiteren Auswertung die Cut-Off-Linie in der selben Weise wie das gespiegelte NESP-Spurbild in die Ausgangslage zurückinvertiert bzw. zurückgespiegelt wird.
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
 - dass bei Vorliegen von Spurbildern, die Bandenbereiche unterschiedlicher Substanzen oder Stoffe, insbesondere von rEPO und NESP, enthalten, zur Trennung der Bandenbereiche der unterschiedlichen Substanzen oder Stoffe für jede Zeile des Spurbildes ein Intensitätswert ($P_{med}(i)$) ermittelt wird, z.B. durch Mittelwertbildung, gewichtete Mittelung, Summierung oder Medianbildung der bzw. für die Intensitätswerte der einzelnen digitalen Bildpunkte dieser Zeile,
 - dass das Profil der Intensitätswerte ($P_{med}(i)$) der Zeilen des Spurbildes einer Glättung, Filterung oder Konvolution unterzogen und ein Profil ($P_{fil}(i)$) ermittelt wird und in diesem Profil ($P_{fil}(i)$) das globale Maximum (Max_1) und das nächst höchste Maximum (Max_2) und das zwischen den beiden Maxima liegende globale Minimum (min) ermittelt werden,
 - dass das Spurbild in Bezug auf die das Minimum (min) enthaltene Zeile (d) in zwei Teilbilder ($L_a(i,j)$, $L_b(i,j)$) aufgeteilt wird,
 - dass der durchschnittliche Intensitätswert (In_{av}) des Profils ($P_{med}(i)$) der Intensitätswerte ermittelt wird,
 - dass für die beiden Teilbilder die partiellen gefilterten Profile bzw. Medianprofile ($PT_{fil}(i)$, $PB_{fil}(i)$) des jeweiligen gefilterten Profils bzw. Medianprofils ($P_{fil}(i)$) ermittelt werden,
 - dass in dem einen, insbesondere oberen, Teilbild ($L_a(i,j)$), das der außenliegenden Spurgrenze (Sp_b) entfernteste lokale Maximum (T_{nsp}) ermittelt wird, dessen Wert den Schwellwert (In_{av}) übersteigt,
 - dass der Zeilenindex dieses Maximums um die der halben durchschnittlichen Bandbreite (Bw_{av}) entsprechende Zeilenzahl erhöht wird und der erhaltene



- Zeilenindex als innere, insbesondere obere, Spurgrenze des jeweils anderen, insbesondere unteren, Teilbildes ($L_{nsp}(i,j)$), insbesondere NESP-Spurbildes, angesehen wird,
- dass im anderen, insbesondere unteren, Teilbild ($L_b(i,j)$) das der außenliegenden Spurgrenze (Sp_b) entferntest liegende Maximum (B_{epo}) ermittelt wird, dessen Wert den Schwellenwert (In_{av}) übersteigt,
 - dass von Zeilenindex dieses Maximums die der halben durchschnittliche Bandbreite (Bw_{av}) entsprechende Zeilenanzahl subtrahiert und der erhaltene Zeilenindex als innere, insbesondere untere, Spurgrenze des ersten Teilbildes ($L_{epo}(i,j)$) angesehen wird, und
 - dass die beiden Teilbilder ($L_{epo}(i,j)$, $L_{nsp}(i,j)$) getrennt für sich als getrennt vorliegende und getrennt auszuwertende Spurbilder jeweils einer einzigen Substanz bzw. eines einzigen Stoffes gemäß den Merkmalen der Patentansprüche 1 bis 6 beginnend mit der Aufteilung des Spurbildes in Blöcke ausgewertet werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zur Filterung des Profils ($P_{med}(i)$) der Intensitätswerte der einzelnen Zeilen zur Trennung der Bandenbereiche der unterschiedlichen Substanzen eine Mittelwertbildung der Intensitätswerte über eine 6 bis 14 %, vorzugsweise 8 bis 12 %, der Zeilenanzahl des gesamten Spurbildes betragende Anzahl von, insbesondere symmetrisch, beidseits der jeweils betrachteten Zeile liegenden Zeilen erfolgt und dieser Wert der betrachteten Zeile als Intensitätswert des Profils ($P_{mz}(i)$) zugeordnet wird.
9. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Auswertung von Bandenbildern in Hinblick auf das Vorhandensein bzw. Vorliegen von zum menschlichen Doping einsetzbaren Präparaten, wie z.B. rEPO und/oder NESP.

~~Wien, am 12. Februar 2004~~

~~ARC Seibersdorf research GmbH~~

~~vertreten durch:~~

~~PATENTANWÄLTE
Dipl.-Ing. Dr. Helmut WILDHACK
Dipl.-Ing. Dr. Gerhard JELLINEK~~



Abbildung 1: EPO Gelbild Beispiel 1

Fig. 1

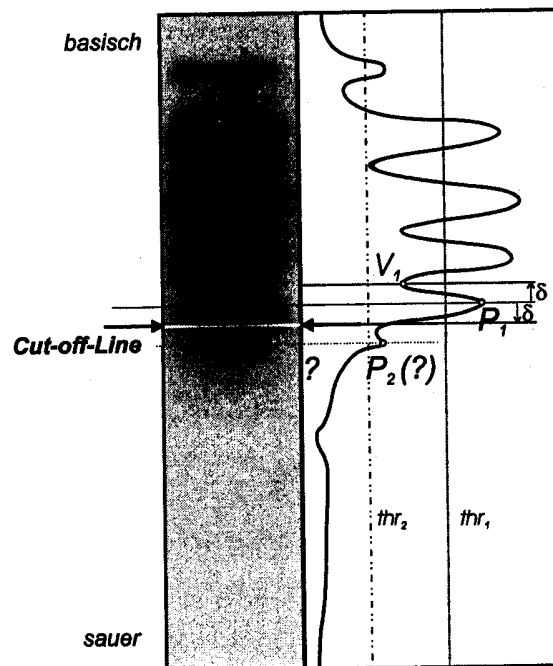


Abbildung 2: Konventionelle Methode der Cut-off-Line Ermittlung

Fig. 2

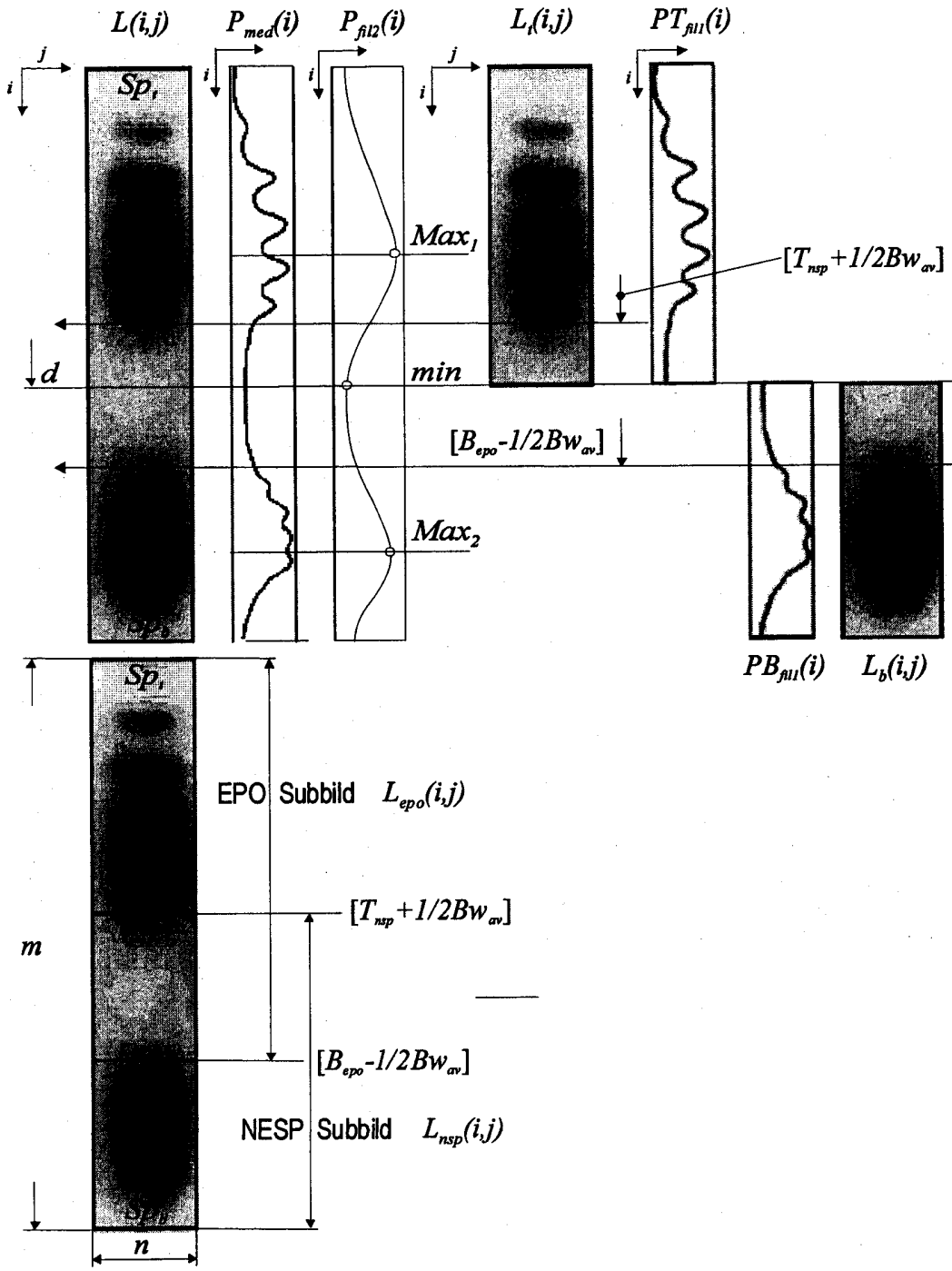
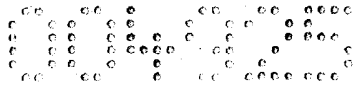
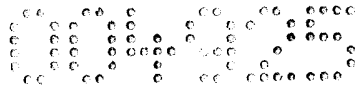


Fig. 5



1

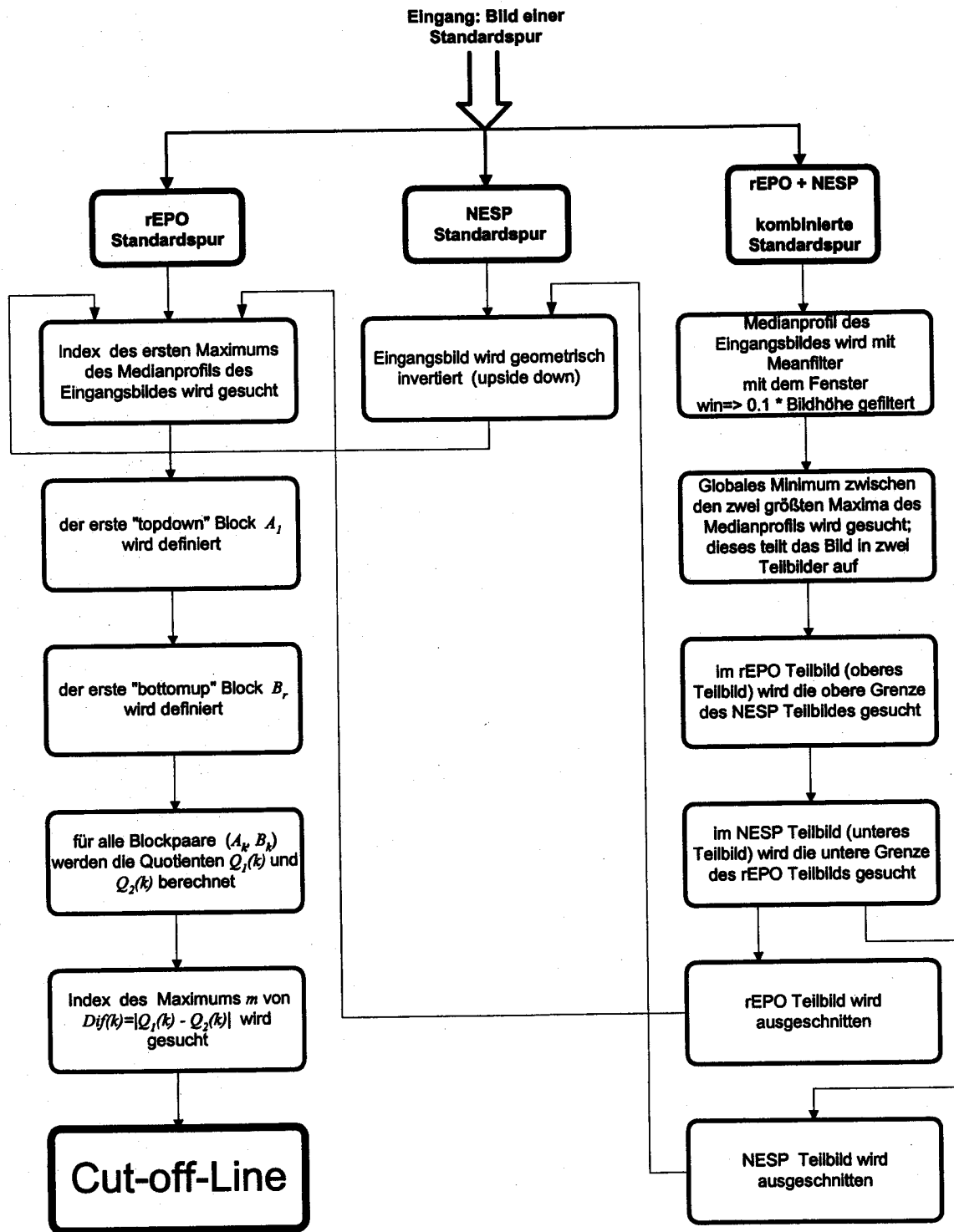


Fig. 6