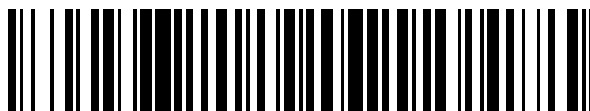


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 850 126**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/564 (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: **11.06.2019 E 19179434 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3591402**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para la detección de anticuerpos**

30 Prioridad:

06.07.2018 EP 18182267

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

25.08.2021

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 2 850 126 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

Dispositivo y procedimiento para la detección de anticuerpos

La presente solicitud se refiere a un procedimiento para detectar anticuerpos en una muestra. Además, la solicitud se refiere a un kit para su uso en un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra.

5 Tradicionalmente, la tecnología de inmunofluorescencia indirecta se utiliza para identificar anticuerpos en muestras líquidas. Por ejemplo, como sustratos de antígenos pueden utilizarse células, secciones de tejido o sustancias purificadas y caracterizadas en forma bioquímica. En una primera etapa de incubación, los anticuerpos detectables (primarios) contenidos en las muestras se unen a los antígenos sólidos en fase sólida. En una segunda etapa de incubación, los anticuerpos antihumanos (secundarios) marcados con fluorescencia se unen a estos anticuerpos unidos a la muestra. En un microscopio de fluorescencia, los anticuerpos secundarios unidos pueden detectarse entonces basándose en su etiquetado fluorescente, que indica la presencia de anticuerpos primarios específicos para cada antígeno de la muestra.

10 El documento WO 2012/094427 A1 desvela los procedimientos para la detección de anticuerpos por fluorescencia. El documento US 2005/0124017 desvela imágenes de fluorescencia para detectar proteínas, anticuerpos, drogas u otros ligandos en una muestra mediante el escaneo de una imagen. El documento US 2004/0253640 desvela un microarreglo con proteínas impresas en él para detectar una proteína objetivo por inmunofluorescencia. El documento WO 2017/025954 A1 desvela un chip antígeno para la detección de inmunofluorescencia, en el que el chip antígeno es escaneado para su detección. El documento WO 2012/052994 A2 desvela microarreglos para la caracterización de alto rendimiento de la respuesta inmune. El documento WO 2012/037369 A desvela la detección de anticuerpos por detección de fluorescencia. El documento WO 2004/027379 A desvela una técnica de esferas rodantes para detectar anticuerpos primarios unidos en un microarreglo de antígenos. El documento WO 2000/063701 A2 desvela microarreglos de polipéptidos para detectar anticuerpos, por ejemplo, utilizando la detección por fluorescencia y escaneando los microarreglos.

El documento US 2017/0016052 A1 desvela los sistemas de matriz con controles internos.

25 El documento WO 2011/101487 A1 desvela un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades mediante la detección simultánea de anticuerpos ligados a sustratos sintéticos y celulares, en el que los anticuerpos se detectan por inmunofluorescencia indirecta. Un sustrato sintético es una micropartícula o una esfera recubierta con un antígeno nativo purificado o un antígeno recombinante, un microscopio de fluorescencia está equipado con una cámara y con un sistema de escaneo.

30 El documento EP 2 362 222 desvela un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades, en el que se detectan simultáneamente anticuerpos unidos a sustratos celulares o de tejidos, o unidos a sustratos sintéticos, como micropartículas o esferas recubiertas con los antígenos específicos. La microscopía de fluorescencia multicolor se utiliza para detectar los anticuerpos unidos, en la que los sustratos y los anticuerpos unidos tienen diferentes colores de fluorescencia.

35 El documento DE 102006027517 A1 desvela un biochip, en el que las moléculas de captura en al menos dos piezas de soporte están fijadas juntas en un soporte. La detección de las moléculas objetivo que se unen a las moléculas de captura puede realizarse mediante fluorescencia.

40 Se ha observado que los sistemas y procedimientos convencionales de detección de anticuerpos no proporcionan una detección fiable de una variedad de anticuerpos en todas las circunstancias y en un tiempo de medición aceptable. Los procedimientos convencionales también requieren una cantidad relativamente grande de antígeno o de muestra. Además, los procedimientos convencionales solo son parcialmente adecuados para aplicaciones de alto rendimiento en diagnósticos médicos rutinarios.

45 Un objeto de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar sistemas y procedimientos que apoyen la detección fiable de una pluralidad de anticuerpos en una muestra líquida, los que, en particular, sean adecuados para los diagnósticos médicos rutinarios, y, además, en particular, proporcionen al menos resultados semicuantitativos.

La tarea se resuelve con los objetos de las reivindicaciones independientes, que están dirigidos a un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra. La tarea además se resuelve por medio de un kit que se utiliza en un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra. Las reivindicaciones dependientes especifican realizaciones particulares de la presente invención.

50 Se describe aquí un chip de antígeno que tiene una superficie de sustrato plana y manchas de antígeno depositadas en la superficie del sustrato en un patrón predeterminado y que contiene un luminóforo, un sustrato cromogénico o el primer tinte, en particular, el primer colorante fluorescente.

55 El chip puede entenderse como un sustrato sólido, como una placa de vidrio o, por ejemplo, una placa de silicio. El chip también puede ser de plástico o incluso de metal. El chip puede ser translúcido o no translúcido para soportar la iluminación o detección de luz transmitida o reflejada. El chip de antígeno puede utilizarse en un escáner o en un

sistema de cámara, en particular, un microscopio de fluorescencia, para examinar una muestra y luego puede irradiarse con luz de iluminación o luz de excitación. La luz de iluminación o de excitación puede excitar el primer tinte, en particular, el fluorescente, en las manchas de antígeno para emitir luz, es decir, para emitir la primera radiación (por ejemplo, la luz de iluminación reflejada por el primer tinte), en particular, la primera fluorescencia. Si un anticuerpo de la muestra se une más a una mancha de antígeno específica y si las manchas de antígeno o todo el chip de antígeno se incuban más con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia, el segundo colorante fluorescente (que se une al anticuerpo secundario) preferiblemente también es excitado para emitir luz, es decir, para emitir una segunda fluorescencia.

La primera fluorescencia puede comprender la emisión de luz en una primera gama de longitudes de onda y la segunda fluorescencia puede comprender la emisión de luz en una segunda gama de longitudes de onda, en la que la primera gama de longitudes de onda y la segunda gama de longitudes de onda tienen poca o prácticamente ninguna área de superposición, como una área de superposición o superposición correspondiente, 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. Puede darse una definición similar con respecto a la segunda fluorescencia. La excitación de la primera y la segunda fluorescencia puede ser de la misma o de diferentes longitudes de onda o intervalos de longitudes de onda.

Las manchas de antígeno pueden ser impresas o manchadas en la superficie plana del sustrato. Esto puede lograrse mediante una técnica de impresión piezoeléctrica, como la que ya se utiliza en el estado de la técnica. El patrón predeterminado puede definir, por ejemplo, la disposición, el tamaño y/o la forma de las manchas de antígeno. El patrón predeterminado puede utilizarse durante la ejecución de un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra para localizar las manchas y/o identificar los respectivos antígenos contenidos en las manchas de antígenos. Por ejemplo, las manchas de antígenos que contienen el mismo antígeno pueden aparecer varias veces en el chip de antígenos y pueden estar dispuestas a lo largo de una línea con un espaciado de manchas específico y/o tener una forma y/o un tamaño específicos. Las manchas de antígeno que contienen un antígeno diferente también pueden estar dispuestas en una línea, pero pueden tener un espaciado de manchas diferente (o el mismo), pueden tener una forma diferente (o la misma) y pueden presentar un tamaño diferente (o el mismo).

El chip de antígeno puede ser usado en un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra de acuerdo a una realización de la presente invención.

El colorante fluorescente puede permitir o facilitar la localización de las manchas de antígeno mediante la detección de la primera radiación, a saber, la detección de la primera fluorescencia, después de la irradiación con luz de iluminación, en particular, la excitación por luz de excitación. De manera selectiva, en las posiciones determinadas de las manchas de antígeno, puede detectarse entonces la segunda fluorescencia, que se produce por la emisión de luz después de la excitación del segundo colorante fluorescente. Cualquier anticuerpo primario y/o secundario unido a la superficie (descubierta) del sustrato plano fuera de todas las manchas de antígeno puede entonces ser detectado como fondo de la medición. Las señales de fluorescencia que se originan en el fondo de la medición pueden entonces sustraerse de las señales de fluorescencia que se originan en las manchas de antígeno, por ejemplo, para aumentar la precisión de la medición.

Se describe además un chip de antígeno configurado de tal manera que las manchas de antígeno que contienen diferentes antígenos contienen diferentes cantidades o concentraciones del primer colorante fluorescente, de tal manera que la primera radiación reflejada en él, es decir, la primera fluorescencia excitada, tiene una intensidad diferente o sustancialmente igual. Por ejemplo, una (o más) fila(s) de manchas de antígenos puede tener un espaciado de manchas de antígenos particular tal que la fila o filas pueden distinguirse de otras filas de manchas de antígenos, proporcionando así una o más filas de referencia. Un rasgo distintivo de las líneas de antígeno/control de cada una puede ser una intensidad diferente de la primera fluorescencia. Por ejemplo, la primera radiación reflejada en las manchas de antígeno de diferentes líneas, en particular, la primera fluorescencia excitada, puede tener una intensidad sustancialmente diferente para distinguir y/o identificar las líneas.

Si las manchas de antígeno que contienen diferentes antígenos emiten sustancialmente la misma intensidad (o intensidad diferente predeterminada) de la primera fluorescencia después de la excitación por la luz de excitación, la localización de las manchas de antígeno puede realizarse de manera más fiable según un procedimiento uniforme. Además, la exposición para capturar una primera imagen puede ajustarse más fácilmente y, en particular, pueden omitirse las capturas múltiples de la primera imagen con diferentes tiempos de exposición. Así, el procedimiento puede llevarse a cabo de manera más rápida y fiable.

Los antígenos contenidos en las diferentes manchas de antígenos pueden detectar enfermedades autoinmunes, alergias y enfermedades infecciosas mediante la unión de anticuerpos. En particular, el sistema de pruebas actual puede incluir anticuerpos antinucleares y antinucleares extraíbles del campo de la colagenosis.

Los antígenos contenidos en las diversas manchas de antígenos pueden ser seleccionados y diseñados para unirse a los anticuerpos formados como resultado de enfermedades autoinmunes, alergias y enfermedades infecciosas. En el sistema de pruebas actual, esto se refiere en particular, a los anticuerpos antinucleares y/o antinucleares extraíbles del campo de la colagenosis. En particular, por ejemplo, los siguientes antígenos (solos o en cualquier combinación) pueden estar contenidos en las manchas de antígenos: RNP/Sm, Sm, Scl-70, Rib.P0, Jo-1, SS-A, SS-B, dsADN,

nucleosomas/cromatina, Cenp-B, RNP A,C,68kDa, Ro-52, Ku, histonas, DFS70. Las colagenosas diagnosticables pueden incluir al menos una de las siguientes: LES (lupus eritematoso sistémico), PM, DM (miositis), SS (síndrome de Sjögren), síndrome CREST (forma cutánea limitada de esclerosis sistémica lcSSc), PSS (esclerosis sistémica progresiva), MCTD (enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sharp), AID (enfermedad autoinducida). Esto puede ser usado para diagnosticar varias enfermedades.

El término "quimioluminiscencia", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una reacción química en la que la energía se dirige específicamente a una molécula, haciendo que se excita en forma electrónica y posteriormente libere un fotón, emitiendo luz visible. La energía térmica no es necesaria para esta reacción. La quimioluminiscencia implica, por lo tanto, la conversión directa de la energía química en energía lumínica. Preferentemente, la quimioluminiscencia resulta de la reacción de un luminóforo con otros compuestos. Estas reacciones pueden ser catalizadas por las enzimas. El luminóforo puede seleccionarse del grupo formado por el luminol y sus derivados, la acridina y sus derivados y las luciferinas. Estos compuestos pueden ser excitados a la quimioluminiscencia por varias reacciones enzimáticas. Los compuestos y reacciones relevantes son conocidos en el estado de la técnica. El luminóforo puede ser el luminol o un derivado del mismo, en el que se emite luz (quimioluminiscencia) por una reacción catalizada por la peroxidasa, en particular, la peroxidasa del rábano picante. El luminóforo puede ser acridina o un derivado de ella, en particular, un éster de acridinio o una sulfonamida de acridinio, en los que la luz se emite por una reacción catalizada por la fosfatasa, en particular, la fosfatasa alcalina (AP) (quimioluminiscencia). El luminóforo puede ser una luciferina, en particular, la D-luciferina, en la que se emite luz mediante una reacción catalizada por la luciferasa (quimioluminiscencia).

Un "sustrato cromogénico" como el descrito aquí es un reactivo que puede ser usado para medir la actividad de las enzimas. El sustrato cromogénico es modificado por la actividad enzimática de manera que se puede cuantificar (fotométricamente) un producto directo o indirecto de la reacción enzimática. El sustrato cromogénico comprende, por ejemplo, un oligopéptido al que se acopla un colorante azoico, por ejemplo, la paranitroanilina. El péptido imita el sitio de ruptura en el que la enzima de interés rompe su sustrato fisiológico. La acción de la enzima libera el tinte. El desarrollo del color puede ser cuantificado fotométricamente y la actividad de la enzima puede ser determinada a través de una curva de calibración. Sin embargo, el sustrato cromogénico también puede ser fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo (BCIP) y/o cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT). Un sustrato cromogénico puede ser detectado, por ejemplo, en forma colorimétrica.

El chip de antígeno puede configurarse de manera que las manchas de antígeno de un antígeno idéntico estén dispuestas cada una en una línea, en particular, con un espaciado de manchas predeterminado, en el que las líneas asignadas a antígenos diferentes, en particular, tienen un espaciado de línea predeterminado, en el que, en particular, el espaciado de líneas de dos líneas es mayor que el espaciado de manchas dentro de una línea. Alternativamente, la distancia entre dos líneas también puede ser menor que la distancia de una mancha dentro de una línea.

Por ejemplo, un sistema de evaluación de un dispositivo para detectar anticuerpos en una muestra puede ser configurado para determinar un espacio de línea entre dos líneas de manchas de antígeno y/o para determinar un espacio de manchas de antígeno dentro de una línea. El espaciado de manchas puede ser específico de las manchas de antígenos que contienen un antígeno en particular. Por lo tanto, el espaciado de manchas determinado puede utilizarse para inferir qué antígeno está contenido en las manchas de antígeno de la línea investigada. También se puede determinar el espaciado entre una primera línea de manchas de antígeno y una segunda línea de manchas de antígeno para determinar esos antígenos o el antígeno contenido en las manchas de antígeno de la segunda línea adyacente a la primera línea para la que ya se ha determinado el antígeno contenido en las manchas de antígeno. Se puede combinar un espaciado de línea y una distancia específica entre manchas para determinar una localización fiable de las manchas de antígeno y/o una asignación de las manchas de antígeno a antígenos particulares.

Las manchas de antígenos pueden tener formas diferentes, en particular, pueden ser sustancialmente circulares y pueden tener tamaños sustancialmente diferentes, en particular, diámetros sustancialmente iguales o diferentes. De esta manera, se pueden utilizar técnicas convencionales de manchado para aplicar las manchas de antígeno a la superficie del sustrato.

El chip de antígeno puede conformarse de tal manera que al menos una, dos, en particular, al menos tres, manchas o líneas de manchas de antígeno (también llamadas manchas de calibración o calibrador interno) que contengan un anticuerpo primario (por ejemplo, IgG) en cantidades o concentraciones idénticas o diferentes estén aplicadas más adelante en la superficie del sustrato. Después de la incubación con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (que está marcado con el segundo colorante fluorescente), también puede emanar una segunda fluorescencia de las manchas de calibración que contienen el anticuerpo primario, en diferentes intensidades que corresponden a las diferentes cantidades o concentraciones del anticuerpo primario. Así, al evaluar las intensidades de la segunda fluorescencia, un sistema de evaluación puede realizar una calibración para permitir la cuantificación de los anticuerpos unidos a otras manchas de antígeno. Por ejemplo, las diferentes cantidades o concentraciones pueden estar predeterminadas o ser conocidas. Las intensidades de la segunda fluorescencia detectadas por los diferentes manchas de calibración pueden asignarse a las cantidades o concentraciones respectivas, y la extrapolación o interpolación puede realizarse a concentraciones intermedias o a concentraciones mayores o menores que las contenidas en las manchas de calibración. Así, el chip de antígeno puede soportar un análisis cuantitativo o al

menos semicuantitativo de los anticuerpos de una muestra. Para una cuantificación precisa, se puede utilizar un calibrador externo (en forma de suero calibrador).

5 El chip de antígeno puede haberse conformado de tal manera que sobre el sustrato se haya aplicado como un control positivo al menos una línea, en particular, una línea de un antígeno con una distancia de manchas menor en comparación con las distancias de manchas de las otras líneas del chip de antígeno. Esta línea puede estar expresada como una línea continua. En otras palabras, el chip de antígeno está conformado de tal manera que sobre el sustrato están marcadas manchas a diferentes distancias hasta formar una línea continua.

10 Las manchas de antígeno que contienen, por ejemplo, el mismo antígeno pueden estar dispuestas a lo largo de una línea, con su espaciado de manchas lo suficientemente cercano como para que las diferentes manchas estén en contacto entre sí y se perciban como una línea continua. Así pues, el chip de antígenos está compuesto por chips que consisten exclusivamente en manchas, exclusivamente en líneas, o en una combinación de manchas y líneas.

15 El control positivo (por ejemplo, IgG antihumana) puede ser usado para determinar si el chip de antígeno particular ha sido incubado con una muestra. Por ejemplo, cada muestra esperada puede contener uno o más anticuerpos particulares en cada caso, incluso si no existe una condición patológica. La posición o ubicación del control positivo también puede ser determinada por el sistema de evaluación y, en particular, puede utilizarse para determinar la orientación del chip de antígeno. Por ejemplo, la orientación de los antígenos en el chip puede estar determinada por el espacio único entre las líneas y/o la disposición de las líneas con diferentes espacios entre sí. De esta manera, se puede realizar un análisis de anticuerpos de manera más fiable.

20 Por ejemplo, el primer colorante fluorescente puede ser fluorescente en un intervalo de longitudes de onda del rojo, por ejemplo, en un intervalo entre 550 nm y alrededor de 800 nm con un máximo entre 650 nm y 700 nm. Por ejemplo, el primer colorante fluorescente DY521XL puede utilizarse para este fin. La excitación del primer colorante fluorescente puede estar en una gama de frecuencias, por ejemplo, entre 450 nm y 650 nm con un máximo, por ejemplo, entre 500 nm y 540 nm. La excitación del segundo colorante fluorescente puede producirse en una gama de longitudes de onda sustancialmente igual a la del primer colorante fluorescente. Así, en un dispositivo para detectar anticuerpos en una muestra, por ejemplo, solo se requiere una única fuente de luz de iluminación para generar la luz de excitación, que puede ser de diseño de banda relativamente estrecha. Así pues, es ventajoso que la luz de excitación pueda filtrarse antes de que una primera cámara detecte la primera fluorescencia y una segunda cámara detecte la segunda fluorescencia o que ambas señales de fluorescencia sean detectadas por la primera o la segunda cámara (por ejemplo, después de un cambio de filtro) sin que se detecte una luz de excitación que interfiera sustancialmente.

30 De acuerdo con una realización de la presente invención, la superficie del sustrato está microestructurada para el enfoque. La microestructuración puede realizarse mediante un tratamiento de la superficie (por ejemplo, el desbaste) y puede facilitar el enfoque en la superficie del sustrato. Varios procesos de microestructuración, como el moldeo por inyección, la estampación en caliente o la impresión, son conocidos en el estado de la técnica. Se pueden aplicar varios marcadores de microestructura a la superficie, que también se pueden utilizar para identificar el chip de antígeno, identificar la muestra, etc.

35 En particular, el sustrato del antígeno (el chip) comprende un área que tiene un tamaño entre 1 mm x 1 mm y 2 mm x 4 mm.

40 De acuerdo con una realización, ninguna de las manchas de antígenos comprende un gel o una mancha de gel o una almohadilla de gel, en particular, un gel de polímero (3D) y/o un gel de poliacrilamida, en el que se unen los antígenos. Según una realización, las manchas de antígeno comprenden sólo, el primer tinte, el sustrato cromogénico o luminóforo, el antígeno y el tampón (seco) sin polímero y/o tienen un grosor entre 0,1 µm y 5 µm.

45 Se señala que las características descritas, explicadas o proporcionadas en relación con un chip de antígeno, individualmente o en cualquier combinación, pueden aplicarse igualmente, en forma individual o en cualquier combinación, a un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra, y viceversa, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

50 Un dispositivo para detectar anticuerpos en una muestra comprende: un chip de antígeno como el descrito en este documento; y un escáner o sistema de cámara con una fuente de iluminación (por ejemplo, un microscopio de fluorescencia) adaptado para generar luz de iluminación, en particular, luz de excitación de una primera longitud de onda, y dispuesto para iluminar, en particular, irradiar, el chip de antígeno; una primera cámara que está diseñada para capturar una primera imagen mediante la detección de la primera radiación emitida por la muestra y causada por la luz de iluminación, en particular, la primera fluorescencia excitada por la luz de excitación, y/o está conformada para capturar una segunda imagen mediante la detección de la quimioluminiscencia emitida por la muestra o la segunda fluorescencia excitada por la luz de iluminación, en particular, la luz de excitación.

55 El escáner y/o el sistema de cámaras, en particular, el microscopio de fluorescencia (55), puede comprender además una segunda cámara configurada para capturar una segunda imagen mediante la detección de la quimioluminiscencia que emana de la muestra o la segunda fluorescencia excitada por la luz de excitación, en particular, cuando la primera cámara no puede realizar la detección de la segunda fluorescencia.

El sistema de escáner o de cámara para detectar la quimioluminiscencia o la fluorescencia, por ejemplo, el microscopio de fluorescencia, puede comprender un portaobjetos en el que se puede colocar el chip de antígeno. El microscopio de fluorescencia puede comprender además una lente objetiva, que puede comprender una o más lentes que pueden utilizarse para producir una imagen ampliada del chip de antígeno o al menos una porción del chip de antígeno cuando la fuente de iluminación ilumina el chip de antígeno. El microscopio de fluorescencia puede comprender además al menos un divisor de haz (por ejemplo, un espejo semitransparente) para dirigir una porción de la luz (fluorescente) emitida por el chip de antígeno a la primera cámara y dirigir otra porción a la segunda cámara. El dispositivo puede estar configurado para capturar la primera imagen simultáneamente con la segunda, o con un retraso de tiempo a partir de esta última. Al capturar la primera imagen y al capturar la segunda, la fuente de iluminación puede dirigir la luz de excitación al chip de antígeno. La luz de excitación excita el primer colorante fluorescente para emitir la primera fluorescencia. También excita un segundo colorante fluorescente (que está unido en particular, a un anticuerpo secundario) para emitir una segunda fluorescencia. Así pues, el dispositivo solo necesita tener una única fuente de iluminación para realizar un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra utilizando el chip de antígeno descrito anteriormente. La fuente de iluminación puede comprender, por ejemplo, un láser, un LED, en particular, cLED. Otras fuentes de luz son posibles.

El dispositivo puede además comprender un primer filtro colocado en un primer camino del haz aguas arriba de la primera cámara y configurado para eliminar sustancialmente la luz de excitación y/o la luz de la segunda fluorescencia, y más particularmente, comprender un segundo filtro colocado en un segundo camino del haz aguas arriba de la segunda cámara y configurado para eliminar sustancialmente la luz de excitación y la luz de la primera fluorescencia. El primer filtro puede permitir que pase un primer intervalo de longitudes de onda alrededor del máximo de la primera fluorescencia, pero puede eliminar sustancialmente un segundo intervalo de longitudes de onda alrededor del máximo de la segunda fluorescencia. Así pues, la localización de las manchas de antígeno puede realizarse de manera fiable. A la inversa, el segundo filtro puede permitir sustancialmente que pase un segundo intervalo de longitudes de onda alrededor del máximo de la fluorescencia de la segunda fluorescencia, mientras que elimina o atenúa sustancialmente la luz del primer intervalo de longitudes de onda alrededor del máximo de la primera fluorescencia. Así, la cantidad de anticuerpos que se unen a las diversas manchas de antígenos o a los antígenos contenidos en ellas puede determinarse de manera fiable. La primera trayectoria del haz o la fluorescencia puede incluir, por ejemplo, luz roja y a veces se denomina canal rojo. La segunda trayectoria del haz o la fluorescencia puede incluir, por ejemplo, luz verde y a veces se denomina canal verde. En otras realizaciones, la luz de otras longitudes de onda se incluye en la primera trayectoria del haz o en la segunda trayectoria del haz o en la primera y en la segunda fluorescencia, pero siempre y cuando las correspondientes gamas de longitudes de onda estén suficientemente separadas entre sí o tengan poca superposición. El sistema puede utilizar una (única) longitud de onda de excitación (o intervalo de longitudes de onda de excitación) para ambos colorantes fluorescentes. Según otra realización, los dos colorantes fluorescentes se excitan con diferentes longitudes de onda o intervalos de longitudes de onda (por ejemplo, con diferentes fuentes de luz).

El dispositivo está configurado para excitar y detectar la fluorescencia, donde la primera y la segunda fluorescencia son excitables en la misma longitud de onda. En otras realizaciones preferidas, la primera fluorescencia se genera por la excitación de DY-521-XL y la segunda por la excitación de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

De acuerdo con una de las realizaciones de la presente invención, el dispositivo puede comprender además un sistema de evaluación configurado para determinar las posiciones de las manchas de antígenos sobre la base de la primera imagen, asignar las posiciones de las manchas de antígenos a los antígenos respectivos sobre la base del patrón predeterminado y detectar los anticuerpos unidos a las manchas de antígenos sobre la base de la segunda imagen, en particular, al menos de manera semicuantitativa.

La primera imagen también puede ser referida como una imagen roja, y la segunda imagen también puede ser referida como una imagen verde. La primera cámara y también la segunda (opcional) pueden, por lo tanto, comprender cada una de ellas un conjunto sensible a la luz (por ejemplo, un conjunto bidimensional) de elementos sensibles a la luz, como los fotodiodos, o pueden formarse, por ejemplo, como un conjunto de sensores CMOS. La primera y también la segunda cámara pueden, por ejemplo, tener una óptica de imagen adecuada.

El sistema de evaluación puede haberse conformado para realizar el procesamiento de imágenes. Por ejemplo, el sistema de evaluación puede estar controlado por un programa informático y puede incluir un procesador adaptado para ejecutar el programa informático. Las posiciones de las manchas de antígeno determinadas por el sistema de evaluación pueden correlacionarse con las posiciones del patrón predeterminado, por ejemplo, para determinar y hacer coincidir la orientación y el aumento en el microscopio. Por ejemplo, el sistema de evaluación puede adaptarse para integrar intensidades (o promedios) en la segunda imagen sobre áreas sobre las que se ha determinado una mancha de antígeno en la primera imagen. Las intensidades de fluorescencia de fondo/del sustrato, por ejemplo, es decir, las intensidades sobre las áreas de la segunda imagen que se encuentran fuera de las manchas de antígeno determinadas en la primera imagen, pueden entonces restarse de estas intensidades integradas o promediadas. Así pues, el sistema de evaluación puede adaptarse para evaluar la segunda imagen a fin de determinar las intensidades de la segunda fluorescencia emitida por las manchas de antígenos individuales y, en particular, las intensidades medias de múltiples manchas de antígenos que contienen el mismo antígeno. El promedio de intensidades derivadas de manchas de antígeno que contienen el mismo antígeno puede aumentar la precisión de la medición.

Según una realización de la presente invención, el sistema de evaluación se adapta ulteriormente para determinar las intensidades de la segunda fluorescencia que emana de al menos una, dos o tres o más manchas de calibración o filas de manchas de calibración en la segunda imagen para realizar la calibración, en la que las manchas de calibración o filas de manchas de calibración contienen un anticuerpo primario (por ejemplo, IgG) en diferentes cantidades o concentraciones. Las cantidades o concentraciones del anticuerpo primario en las manchas de calibración pueden ser conocidas previamente o predefinidas. Una dependencia de la concentración o la cantidad y la intensidad obtenida puede derivarse del sistema de evaluación mediante la detección de las intensidades que emanan de las manchas de calibración o de las series de manchas de calibración. Por ejemplo, la cantidad de anticuerpos de diferentes muestras puede determinarse en relación con cada una de ellas en el curso de la enfermedad de un paciente determinado. A la inversa, una intensidad detectada de la segunda fluorescencia que emana de una determinada mancha de antígeno puede utilizarse entonces para inferir la concentración o la cantidad de anticuerpo ligado a esa mancha de antígeno para permitir una evaluación cuantitativa o, al menos, semicuantitativa.

Según una realización de la presente invención, el sistema de evaluación se adapta aún más para detectar en la primera imagen al menos una línea, en particular, una línea con una distancia entre manchas más pequeña en comparación con las distancias entre manchas de las otras líneas del chip de antígeno, de un antígeno (como control positivo) para determinar una orientación del chip de antígeno.

De acuerdo con una de las realizaciones de la presente invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de un chip de antígeno para el diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta, que comprende la aplicación de manchas de antígeno que contienen un primer colorante fluorescente a una superficie plana de un sustrato en un patrón predeterminado para cada antígeno, fragmentando el sustrato (por ejemplo, en trozos en lugares arbitrarios y/o curvas de fractura, es decir, fragmentación posicionalmente inexacta) para obtener múltiples chips de antígeno. En las realizaciones preferidas, dado que el fragmento es más grande que un conjunto, hay al menos un arreglo completo de manchas para un arreglo en un chip/sustrato. La fragmentación del sustrato en múltiples trozos para obtener múltiples chips de antígeno puede hacerse con cierta inexactitud con respecto a la colocación de las líneas de ruptura o de corte. Para realizar un procedimiento de detección de anticuerpos no es necesario el posicionamiento absoluto de las manchas de antígeno con respecto a los bordes del chip de antígeno, porque durante el procedimiento de detección se determinan las posiciones de las manchas de antígeno sin asumir un posicionamiento predeterminado absoluto de las manchas de antígeno. En las realizaciones preferidas con al menos dos manchas de antígenos de referencia o filas de manchas de antígenos de referencia, es posible girar el sustrato de antígenos 180° (por ejemplo, durante el proceso de fabricación) y, sobre la base de las al menos dos manchas de antígenos de referencia o filas de manchas de antígenos de referencia con, por ejemplo, espaciados/patrones de manchas distinguibles, asignar de manera inequívoca las manchas de antígenos. Así pues, se pueden aplicar procesos de fabricación relativamente imprecisos o procesos de fragmentación, que pueden simplificar el esfuerzo, el costo y la complejidad de la fabricación.

La aplicación de las manchas de antígeno puede realizarse mediante un microdispensador piezoeléctrico, y la superficie del sustrato puede ser, en particular, una superficie de un sustrato de vidrio o un sustrato de vidrio recubierto con una membrana y/o película. Por lo tanto, la fabricación es factible utilizando materiales básicos y máquinas de fabricación convencionales.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para detectar anticuerpos en una muestra, en particular, mediante inmunofluorescencia indirecta, mientras el procedimiento comprende: proporcionar manchas de antígeno que contengan un primer colorante fluorescente y estén dispuestas en un sustrato plano en un patrón predeterminado, incubando las manchas de antígeno con la muestra; incubar las manchas de antígeno con un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante fluorescente; iluminar las manchas de antígeno con luz de iluminación, en particular, luz de excitación, para emitir una primera radiación (por ejemplo luz retrodispersada de dichas manchas, en particular, del primer colorante fluorescente) para excitar la primera fluorescencia del primer colorante fluorescente (por ejemplo, el canal rojo) y para excitar la segunda fluorescencia del segundo colorante fluorescente (por ejemplo, el canal verde), detectar dicha primera radiación, es decir, dicha primera fluorescencia, capturar una primera imagen con una primera cámara y capturar una segunda imagen con dicha primera o segunda cámara para determinar las posiciones de dichas manchas de antígeno; asociar dicha primera fluorescencia con dicho segundo colorante fluorescente y dicha segunda fluorescencia con dicho segundo colorante fluorescente; y detectar dicha segunda fluorescencia capturando una segunda imagen con dicha segunda cámara.

El posicionamiento de las manchas de antígeno a los respectivos antígenos basándose en el patrón predeterminado; y la detección de la segunda fluorescencia en la segunda imagen para detectar (en particular, en forma cuantitativa) los anticuerpos unidos a las manchas de antígeno.

La primera y la segunda fluorescencia son excitables en la misma longitud de onda. En otras realizaciones preferidas, la primera fluorescencia se genera por la excitación de DY-521-XL y la segunda por la excitación de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

El procedimiento puede realizarse utilizando un dispositivo de detección de anticuerpos como se describe en este documento. Además, el segundo colorante fluorescente puede ser seleccionado de tal manera que puede ser excitado con luz de excitación adecuada para excitar el primer colorante fluorescente, pero se torna fluorescente en una segunda gama de longitudes de onda que es sustancialmente diferente de una primera gama de longitudes de onda

en la que el primer colorante fluorescente es fluorescente. La muestra puede ser, por ejemplo, un suero, un plasma u otro material de muestra, como el de origen humano. La primera imagen puede estar compuesta por una pluralidad de primeras subimágenes (por ejemplo, cuatro subimágenes) que muestran diferentes sub-áreas del chip de antígeno. Análogamente, la segunda imagen puede estar compuesta por una pluralidad de imágenes parciales (por ejemplo, cuatro imágenes parciales) adquiridas secuencialmente de diferentes áreas parciales del chip de antígeno. En otras realizaciones, solo una primera imagen es capturada de todo el chip de antígeno a la vez, y solo una segunda imagen es capturada de todo el chip de antígeno.

En las realizaciones preferidas, el procedimiento de detección de anticuerpos puede comprender el llamado "calibrador de corte" y su medición. El calibrador de corte se utiliza como referencia para distinguir las señales "positivas" de las "negativas". La naturaleza del calibrador de corte puede estar adaptada a los parámetros dados del sistema de detección y puede ser modificado, por ejemplo, según la naturaleza del antígeno, el anticuerpo y el tinte, a saber, el colorante fluorescente. En otras realizaciones preferidas, el calibrador de corte puede ser un calibrador externo. Puede tratarse de una muestra de calibración cuya concentración es, por ejemplo, aproximadamente igual al límite de la muestra a medir. Esta muestra de calibración puede incubarse en un conjunto separado (del mismo lote de conjunto) en paralelo y relativamente referido a las intensidades obtenidas con las muestras. En otras realizaciones, el calibrador de corte puede ser un calibrador interno, siendo el calibrador una mancha en el chip de antígeno de la invención que comprende un material calibrador apropiado, como una mancha de IgG humana.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un kit para su uso en un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra, en particular, mediante inmunofluorescencia indirecta. El kit consta de un chip de antígeno y una sonda, en particular, el anticuerpo secundario, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, etiquetada con un segundo colorante fluorescente. El primer y el segundo colorante fluorescente del kit pueden (pero no es necesario) ser excitados por un intervalo sustancialmente igual de longitudes de onda. El primer y segundo colorante son cada uno un colorante fluorescente y la primera y segunda fluorescencia son excitables en la misma longitud de onda, con diferentes espectros de emisión, en particular, los máximos de emisión. En las realizaciones preferidas, los máximos de emisión de los dos colorantes fluorescentes que se excitan de forma comparable son al menos 10 nm, al menos 20 nm, al menos 25 nm, al menos 30 nm, al menos 35 nm, al menos 40 nm, al menos 45 nm, al menos 50 nm, al menos 55 nm, o al menos 60 nm de separación. En otras realizaciones preferidas, la primera fluorescencia se produce por excitación de DY-521-XL y la segunda por excitación de isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Las realizaciones de la presente invención permiten que un primer colorante (fluorescente) localice una mancha de un conjunto y utilice esa localización para medir una señal, como un segundo fluoróforo.

Un portaobjetos también puede comprender una pluralidad de chips de antígenos (en particular, 2, 3, 4, 5, 6, 7, etc.) en lugar de un chip de antígenos, y las características de las manchas de antígenos descritas aquí para un solo chip de antígenos, así como el patrón predeterminado de las manchas de antígenos, pueden aplicarse a la pluralidad de chips de antígenos (para cada uno individualmente o en su totalidad). Por ejemplo, en un portaobjetos que comprende dos chips de antígeno según la invención, el primer chip de antígeno puede comprender un control de incubación y el segundo chip de antígeno puede comprender una línea de manchas de calibración. Así, los arreglos y características de las manchas descritos aquí para un chip de antígeno pueden ser realizados por la pluralidad de chips de antígeno en su totalidad sin que cada chip de antígeno individual de la pluralidad de chips de antígeno tenga estos arreglos y características de manchas por su cuenta.

Las realizaciones de la presente invención permiten además (por separado o en combinación) delimitar una o más filas de manchas de antígenos a partir de otras filas de manchas de un chip de antígenos (por ejemplo, mediante el espaciado de las manchas individuales) para determinar inequívocamente la orientación del chip y, por lo tanto, el tipo de filas de manchas de antígenos (por ejemplo, cuando el chip contiene filas de manchas con antígenos diferentes).

Un chip de antígeno puede comprender al menos una fila de manchas de antígeno o al menos una fila de manchas de calibración, preferiblemente al menos dos filas de manchas de antígeno o filas de manchas de calibración, que pueden distinguirse de las otras filas de manchas en al menos una de las siguientes opciones de etiquetado:

- tipo de colorante (por ejemplo, en términos de emisión reflejada o excitada);
- intensidad (cantidad o concentración) del colorante;
- distancia entre la fila de manchas de antígenos y otras filas de manchas de antígenos (distancia L en la Fig. 2A);
- distancia de las manchas de antígeno dentro de una fila (distancia d en la Fig. 2A);
- forma (por ejemplo, circular, rectangular, cuadrada, ovalada, línea continua) de las manchas de antígeno; y/o
- extensión (o expansión/ diámetro) de las manchas de antígeno.

- De esta manera se puede lograr la ventaja técnica de que la producción del chip de antígenos puede tolerar un posicionamiento menos preciso de las manchas de antígenos o una fragmentación menos precisa (por ejemplo, la rotura del cristal), ya que cuando se utiliza el chip de antígenos en un sistema de escáner o cámara, la identificación y localización de las manchas de antígenos se realiza evaluando la primera imagen, sin necesidad de un posicionamiento predeterminado de la mancha de antígenos y/o el sustrato del chip de antígenos en relación con el sistema de cámara.
- Las realizaciones de la presente invención se explicarán ahora con referencia a las figuras adjuntas. La invención no se limita a las representaciones ilustradas o descritas.
- La Fig. 1 ilustra en vista de plano un deslizamiento que contiene una pluralidad de chips de antígeno de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La Fig. 2A ilustra esquemáticamente un chip de antígeno que tiene manchas de antígeno en un patrón predeterminado de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La Fig. 2B ilustra una primera imagen de localización de manchas de antígeno evaluada y adquirida de acuerdo con una realización;
- La Fig. 3 ilustra esquemáticamente un dispositivo para la detección de anticuerpos en una muestra de acuerdo con una realización de la presente invención;
- Las Figs. 4 y 5 ilustran una primera y una segunda imagen, respectivamente, capturadas y analizadas de acuerdo con las características de la presente invención;
- La Fig. 6 ilustra un espectro de emisión de una fuente de iluminación de un dispositivo de acuerdo con una realización de la presente invención;
- La Fig. 7 ilustra un espectro de excitación y un espectro de emisión de un colorante utilizado en las realizaciones de la presente invención; y
- La Fig. 8 ilustra los espectros de emisión de dos colorantes fluorescentes como pueden usarse en las realizaciones de la presente invención.
- El portaobjetos 1 ilustrado en la Fig. 1 en vista de planta comprende diez campos de portaobjetos 3, que están dispuestos en dos filas de cinco campos 3 cada uno y numerados del 1 al 10. Cada campo 3 comprende en la Fig. 1 seis chips de antígeno 5 (en otras realizaciones preferidas puede haber 1, 2, 3, 4, o 5 chips de antígeno 5), los cuales se proporcionan de acuerdo con una realización de la presente invención. Por ejemplo, un chip de antígeno 5 se muestra en forma esquemática en la Fig. 2A. El chip de antígeno 5 comprende un sustrato 7 con una superficie de sustrato plana 9. Las manchas de antígeno 11a, 11b, 11c, 11d, 11e se depositan en la superficie del sustrato 9 en un patrón específico, en el que las manchas de antígeno 11a, 11b, 11c, 11d, 11e comprenden cada una un primer colorante fluorescente, en el que la línea 11a se deposita en el chip de antígeno en una doble realización. En otras realizaciones, también es posible una sola realización de la línea 11a. En la superficie del sustrato 9, se aplica la línea 13 con un mayor espaciado de manchas en comparación con las líneas 11a, 11b, 11c, 11d, 11e, lo que permite determinar si el chip de antígeno 5 ha sido incubado con una muestra. Además, se aplica al chip de antígeno 5 una línea 15 formada por una pluralidad de manchas de calibración 17 que contiene un anticuerpo primario en cantidades o concentraciones iguales o diferentes.
- Las manchas de antígeno 11a están dispuestas a lo largo de una línea y cada una contiene el mismo antígeno. De manera similar, las manchas de antígeno 11b, 11c, 11d y 11e están cada una dispuestas en una línea y contienen un mismo antígeno para cada línea. En un chip de antígeno 5, las manchas dispuestas en líneas para un antígeno pueden tener más o menos manchas que las mostradas, por ejemplo, entre dos y veinte manchas para cada antígeno, en particular, entre cuatro y diez manchas para cada antígeno. Los antígenos de una línea de manchas de antígenos pueden estar presentes en una concentración o cantidades iguales o diferentes en las respectivas manchas de antígenos. Una línea de manchas de antígenos puede caracterizarse por una distancia d entre las manchas, y por un tamaño y/o forma de las manchas. Las distancias d entre las manchas pueden ser diferentes o sustancialmente iguales para líneas que contienen cada una antígenos diferentes. Las manchas de antígeno 11a, 11b, 11c, 11d, 11e dispuestas en líneas están separadas entre sí por una cierta distancia L . La distancia entre las diferentes líneas de los diferentes antígenos puede variar. Las formas de las manchas de antígenos de las manchas 11a, 11b, 11c, 11d, 11e son sustancialmente circulares. El patrón en el que se depositan las diferentes manchas de antígenos 11a, 11b, 11c, 11d, 11e, en particular, las manchas, en la superficie del sustrato 9 está dado o definido por la distancia d entre manchas (que puede ser diferente o la misma en cada una de las líneas) y el espaciado de líneas L (que también puede ser diferente o el mismo entre diferentes pares de líneas) y también por la forma y/o el tamaño de todas las manchas de antígenos.
- Un sistema de evaluación (como el que se muestra en la Fig. 3) puede conocer la geometría del patrón en el que se depositan las manchas de antígeno en la superficie del sustrato, y también puede conocer la ocupación de las manchas individuales por los antígenos. El reconocimiento de este patrón en las imágenes capturadas puede entonces permitir

la asignación de las manchas de antígeno a antígenos específicos, y por lo tanto la asignación de anticuerpos ligados a antígenos específicos.

5 La figura 2B ilustra en forma esquemática una imagen 19 capturada por un dispositivo (por ejemplo, a partir de 4 imágenes parciales) del chip de antígeno 5 ilustrado, por ejemplo, en la Fig. 2A. Para capturar la imagen 19 (por ejemplo, una primera imagen), se detectó la primera fluorescencia, que se emite al emitir luz del primer colorante fluorescente. Como se ha explicado anteriormente, el primer colorante fluorescente está presente en todas las manchas de antígeno 11a, 11b, 11c, 11d y 11e, así como en las líneas de control positivo 13 y en las manchas de calibración 17. Las intensidades de la primera fluorescencia capturada en la imagen 19 se representan como sombras de gris, con sombras de gris más claras que indican una mayor intensidad detectada. Las manchas o áreas brillantes 10 21, 23 y 25, respectivamente, se denominarán en adelante "primeras manchas de fluorescencia". Como se puede observar en las Figs. 2A y 2B, las primeras manchas fluorescentes 21, 23 y 25 aparecen en las posiciones exactas en las que las manchas de antígeno/anticuerpo 11a, 11b, 11c, 11d, 11e y la línea 13 y 15, respectivamente, se depositaron en la superficie del sustrato 9. Un sistema de evaluación detecta, por comparación con el patrón previamente conocido, que, por ejemplo, las columnas 35 de las primeras manchas fluorescentes 21 se derivan de la primera fluorescencia que proviene de las manchas de antígeno 11e. Además, el sistema de evaluación determina que las columnas 27, 29, 15 31, 33 y 35 se originan por la fluorescencia proveniente de las manchas de antígeno 11a, 11b, 11c, 11d y 11e, respectivamente. Así, el sistema de evaluación es capaz de hacer una asignación a un antígeno particular o un control o calibración positiva para cada área de la imagen 19.

20 La figura 3 ilustra en forma esquemática un dispositivo 50 para la detección de anticuerpos en una muestra de acuerdo con una realización de la presente invención. A este respecto, el dispositivo 50 comprende un chip de antígeno 5, por ejemplo, el chip de antígeno 5 ilustrado en la Fig. 2A. Además, el dispositivo comprende un microscopio de fluorescencia 55 que tiene una fuente de iluminación 57 adaptada para generar luz de excitación 59 y dispuesta para irradiar el chip de antígeno 5 con la luz de excitación 59. En detalle, la fuente de iluminación 57 comprende un LED 58 y una óptica de imagen 60 para iluminar completamente o al menos parcialmente el chip de antígeno 5. Además, el microscopio de fluorescencia 55 comprende una primera cámara 61 configurada para capturar una primera imagen (por ejemplo, la imagen 19 de la Fig. 2B) detectando la primera fluorescencia 63 excitada por la luz de excitación 59 que proviene de la muestra. Además, el microscopio de fluorescencia 55 comprende una segunda cámara 65 configurada para capturar una segunda imagen (por ejemplo, véase la figura 5) mediante la detección de una segunda fluorescencia 67 emitida por la muestra excitada por la luz de excitación 59. El microscopio de fluorescencia 30 comprende además un objetivo 69 (que tiene una o más lentes) adaptado para producir una imagen ampliada del chip de antígeno 5.

Después de que el chip de antígenos 5 ha sido incubado con una muestra que contiene potencialmente anticuerpos que se unen a uno o más de las manchas de antígenos, la muestra se incuba con un segundo anticuerpo fluorescente marcado con colorante. La luz de excitación 59 excita tanto el primer colorante fluorescente (que está contenido en las manchas de antígeno) como el segundo colorante fluorescente (el que, por ejemplo, está ligado a un anticuerpo secundario) para excitar la primera y la segunda fluorescencia, respectivamente, cuya luz pasa simultáneamente por el objetivo 69. Aguas abajo de la lente del objetivo, se dispuso un filtro de luz de excitación 70 para filtrar porciones sustanciales de la luz de excitación 59, pero para permitir sustancialmente el paso de la luz de la primera fluorescencia 63 y también la luz de la segunda fluorescencia 67. La luz de la primera y segunda fluorescencia incide entonces en un espejo semitransparente 72, que refleja una parte para incidir y pasar a través de un primer filtro 62. El primer filtro 62 se dispone en una primera trayectoria de rayo ascendente de la primera cámara 61 y está configurado para eliminar sustancialmente la luz de excitación 59 y la luz de la segunda fluorescencia 67. Así, sustancialmente solo la luz 63 de la primera fluorescencia es incidente en la primera cámara 61. Una parte de la luz de fluorescencia es transmitida por el espejo semitransparente 72 y pasa a través de un segundo filtro 66, que se dispone en un segundo camino óptico 45 aguas arriba de la segunda cámara 65 y se adapta para eliminar sustancialmente la luz de excitación 59 y la luz de la primera fluorescencia 63. Así, sustancialmente solo la luz 67 de la segunda fluorescencia incide en la segunda cámara 65.

El dispositivo 50 comprende además un sistema de evaluación 75 que recibe las primeras y segundas imágenes capturadas por la primera cámara 61 y la segunda cámara 65, respectivamente, y está adaptado para evaluarlas. Para 50 ello, a partir de la primera imagen (por ejemplo, la imagen 19 de la Fig. 2B), se determinan las posiciones de las manchas de antígeno y se asignan las posiciones de las manchas de antígeno respectivamente a los antígenos en función del patrón predeterminado. Sobre la base de las primeras manchas fluorescentes 21, 23 y 25 situadas en la primera imagen, las intensidades detectadas en la segunda imagen (por ejemplo, en las figuras 4 o 5) pueden asignarse entonces a antígenos específicos para detectar así cualitativamente o al menos de modo semicuantitativo 55 los anticuerpos ligados.

Las figuras 4 y 5 ilustran ejemplos de una primera imagen 19 y una segunda imagen 77, respectivamente, obtenidas y procesadas por el sistema de evaluación 75. Se determinan las posiciones y tamaños de las primeras manchas fluorescentes 21, 23 y 25 detectadas por el sistema de evaluación 75 en la primera imagen 19. Las posiciones y tamaños de las primeras manchas fluorescentes determinadas en la primera imagen 19 se transfieren luego a la segunda imagen 77 para definir las áreas donde las manchas de antígenos que contienen antígenos conocidos estaban originalmente presentes en el chip de antígenos. Estas áreas contienen entonces segundas manchas fluorescentes 79, 81, 82 cuyas intensidades (es decir, la intensidad de la luz de la segunda fluorescencia) son 60

- asignadas a antígenos específicos por el sistema de evaluación 75. Para poder realizar una cuantificación, el sistema de evaluación puede adaptarse aún más para determinar la segunda fluorescencia que proviene de al menos dos, en particular, al menos tres manchas de calibración en las segundas intensidades de imagen para realizar una calibración. Las manchas de calibración 17 del chip de antígeno 5 de la Fig. 2A pueden, por ejemplo, contener un anticuerpo primario (por ejemplo, IgG) en cantidades o concentraciones iguales o diferentes. Los anticuerpos secundarios también se unirán a este anticuerpo primario después de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con el segundo colorante fluorescente, de modo que la segunda fluorescencia también provendrá de estas áreas, lo que dependerá de la concentración original del anticuerpo primario.
- En particular, la identificación automática de manchas en el canal rojo y la asignación de los diferentes antígenos puede ser realizada por el sistema de evaluación. Se puede realizar una evaluación cualitativa o cuantitativa automática de la reactividad del antígeno en el canal verde. Se puede realizar una evaluación semicuantitativa utilizando sueros de control normalizados y una indicación de los valores de intensidad de la fluorescencia para cada antígeno. También se puede generar una curva de calibración para la fluorescencia verde usando puntos de IgG humanos.
- Las realizaciones de la presente invención también proporcionan un procedimiento de fabricación de un chip de antígeno, en el que se aplican manchas de antígeno que contienen un colorante fluorescente a una superficie plana de un sustrato en un patrón predeterminado para cada antígeno, y el sustrato se fragmenta entonces (sin requerir un posicionamiento preciso de las líneas de separación) para obtener múltiples chips de antígeno. Los antígenos pueden depositarse mediante un microdispensador piezoeléctrico, por ejemplo, sobre vidrio o sobre una membrana o lámina recubierta de vidrio. Puede incubarse una muestra del paciente (por ejemplo, suero o plasma).
- Por ejemplo, el chip de antígeno puede tener un tamaño de 1,4 mm x 2 mm. Por lo general resulta problemática la colocación precisa de las manchas de antígeno en la superficie de un sustrato. Puede obviarse esta necesidad por medio de realizaciones de la presente invención, ya que las posiciones de las manchas de antígeno son determinadas en el proceso propiamente dicho.
- La figura 6 ilustra un ejemplo de un espectro de emisión 83 de una fuente de iluminación 58 de acuerdo con una realización de la presente invención, con la longitud de onda trazada en una abscisa 85 y la emisión relativa trazada en una ordenada 87. El espectro 83 muestra una emisión entre 440 nm y 520 nm con un máximo a unos 470 nm. Este espectro de emisión puede utilizarse para generar luz de excitación 59 para excitar la primera y la segunda fluorescencia.
- La Fig. 7 ilustra un espectro de excitación 89 o un espectro de emisión o fluorescencia 91 de un primer colorante fluorescente que puede utilizarse en las realizaciones de la presente invención, con la longitud de onda trazada en la abscisa 85 y la absorbancia o intensidad de emisión trazada en la ordenada 93. La excitación se produce desde unos 450 nm hasta unos 605 nm con un máximo a unos 520 nm. La emisión se produce desde unos 555 nm hasta unos 800 nm con un máximo a unos 670 nm. El ejemplo ilustrado aquí en la Fig. 7 es la absorción o emisión del colorante DY521XL (por ejemplo, el primer colorante fluorescente).
- En la figura 8 se ilustran a modo de ejemplo los espectros de emisión o de fluorescencia 95 y 97 de un primer colorante fluorescente y un segundo colorante fluorescente, respectivamente, mientras de nuevo se indica la longitud de onda en la abscisa 85 y la intensidad de la emisión en la ordenada 93. Como puede verse en la Fig. 8, las emisiones de la primera fluorescencia 95 y la segunda fluorescencia 97 se superponen solo en un pequeño intervalo, y por lo tanto son específicas para, por un lado, la detección de la espina y, por otro lado, la detección de los anticuerpos secundarios ligados. La emisión de fluorescencia 97 puede realizarse, por ejemplo, mediante el FITC, la fluorescencia 95 puede realizarse, por ejemplo, mediante el PI (yoduro de propidio).
- Las realizaciones de la presente invención pueden prescindir de un proceso de escaneo para capturar las primeras y segundas imágenes. Por ejemplo, el aumento proporcionado por la lente del objetivo 69 puede ser de 5, 8, 10, 15, 20 o 40 veces. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, alrededor de 300 pl de una solución de antígeno de una concentración de alrededor de 0.2 mg/ml es suficiente por mancha de antígeno. Se puede incubar una muestra de paciente de aproximadamente 0,3 a 3 µl por campo (es decir, seis chips de antígeno) en forma diluida.

REIVINDICACIONES

1. Un kit que se utiliza en un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra, en particular, mediante inmunofluorescencia indirecta, que comprende
 un chip de antígenos (5), comprendiendo dicho chip de antígenos:
 - 5 i) una superficie de sustrato plana (9); y
 - ii) manchas de antígeno (11a, ..., 11e) aplicadas en la superficie del sustrato en un patrón predeterminado y que contienen un primer colorante fluorescente; y
 una sonda, en particular, un anticuerpo secundario, etiquetada con un segundo colorante fluorescente, siendo que la primera y la segunda fluorescencia poseen una excitación máxima entre 500 nm y 540 nm y las emisiones máximas de los dos colorantes fluorescentes están separadas en al menos 5 nm.
- 10 2. Un procedimiento de detección de anticuerpos en una muestra, en particular, mediante inmunofluorescencia indirecta, comprendiendo dicho procedimiento:
 - proporcionar manchas de antígeno (11a, ..., 11e) que comprenden un primer colorante fluorescente y están dispuestas en un sustrato plano (7) en un patrón predeterminado;
 - 15 incubar las manchas de antígeno con la muestra;
 - incubar las manchas de antígeno con un anticuerpo secundario marcado con un segundo colorante fluorescente que se une a un anticuerpo primario de la muestra;
 - iluminar las manchas de antígeno (11a, ..., 11e) con luz de iluminación, en particular, luz de excitación (59), para excitar una primera fluorescencia (63) del primer colorante fluorescente y una segunda fluorescencia (67) del segundo colorante fluorescente;
 - 20 detectar la primera fluorescencia mediante la captura de una primera imagen (19) con una primera cámara (61) para determinar las posiciones de las manchas de antígeno;
 - asignar las posiciones de las manchas de antígenos a los respectivos antígenos basándose en el patrón predeterminado; y
 - 25 detectar las señales de la segunda fluorescencia mediante la captura de una segunda imagen (77) con la primera o segunda cámara (65) para detectar los anticuerpos ligados a las manchas de antígeno,
 - en el que se tolera, en particular, la inexactitud de la posición de las manchas de antígeno en el sustrato (7) y/o del sustrato en relación con la primera y/o la segunda cámara,
 - 30 en el que se produce la excitación de la primera y la segunda fluorescencia en la misma longitud de onda, y en el que los máximos de emisión de los dos colorantes fluorescentes están separados al menos 5 nm.
- 35 3. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que las manchas de antígenos (11a, ..., 11e) que contienen diferentes antígenos contienen diferentes cantidades o concentraciones del primer colorante fluorescente, de manera que la primera fluorescencia reflejada en él presenta una intensidad sustancialmente igual o
 - que la primera fluorescencia reflejada en las manchas de antígenos de diferentes líneas tiene una intensidad sustancialmente diferente para poder distinguir las líneas.
- 40 4. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que
 - a) las manchas de antígenos (11a, ..., 11e) de un antígeno idéntico están dispuestas cada una en una línea, en particular, a una distancia d) predeterminada entre manchas en la que las líneas asignadas a diferentes antígenos en particular, presentan una distancia entre líneas (L) predeterminada y/o una disposición, en el que, además, en particular, la distancia entre dos líneas es mayor que la distancia entre manchas dentro de una línea, y/o
 - 45 b) las manchas de antígenos (11a, ..., 11e) de un mismo antígeno están dispuestas cada una en una línea, y al menos dos líneas presentan una distancia (d) predeterminada entre manchas que puede distinguirse.
5. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que además se aplicaron sobre la superficie del sustrato por lo menos dos, en particular, por lo menos tres, manchas de calibración (17) que contienen un anticuerpo primario en cada caso en diferentes cantidades o concentraciones (9).

6. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que además se aplican al menos una línea (13) de un antígeno, en particular, una línea con una distancia de manchas mayor o menor en comparación con las otras líneas del chip del antígeno, en el sustrato como control positivo.
7. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- 5 a) la superficie del sustrato (9) está microestructurada para el enfoque y, en particular, la superficie del sustrato (9) presenta un tamaño entre 1 mm x 1 mm y 2 mm x 4 mm, y/o
- b) el chip de antígeno posee un calibrador de corte.
8. Un kit y un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer colorante fluorescente es el DY-521-XL y el segundo colorante fluorescente es el isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- 10

15

Fig. 1

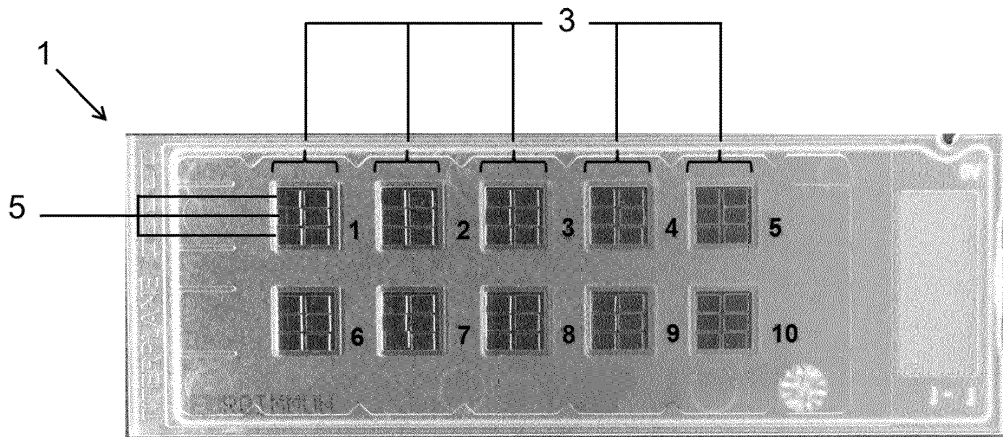


Fig. 2

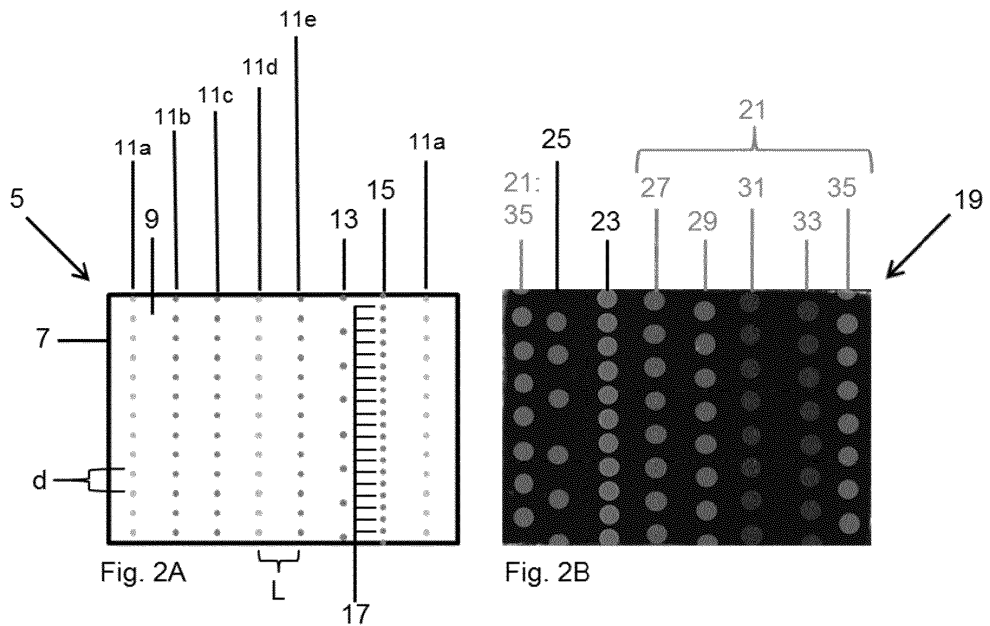
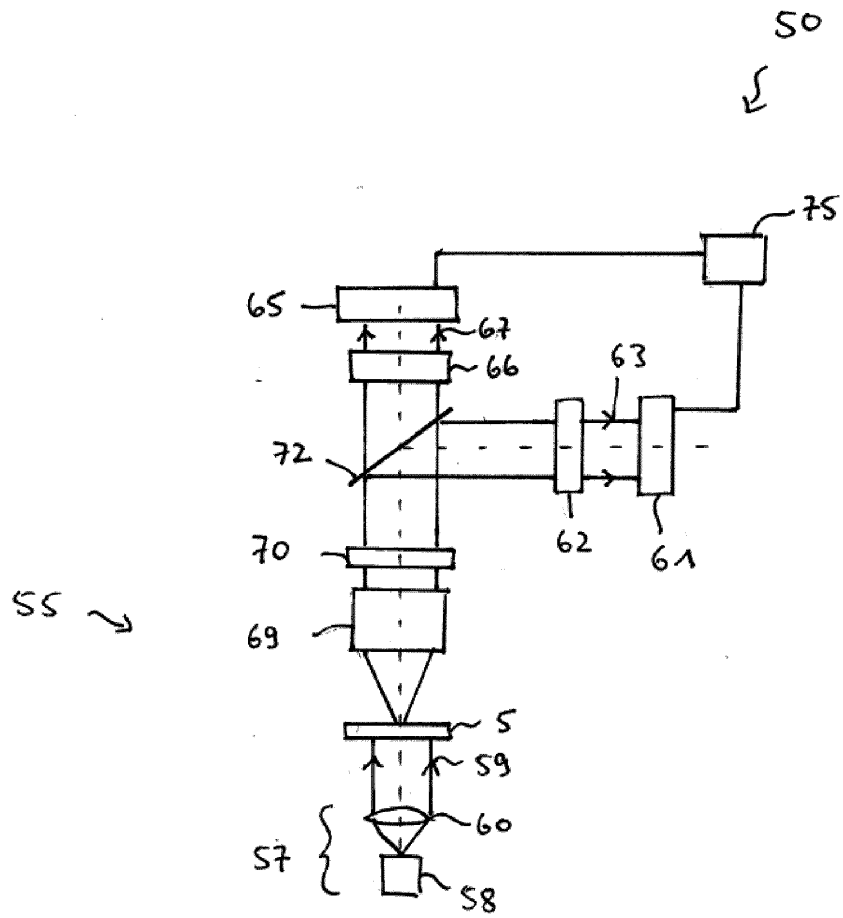


Fig. 3



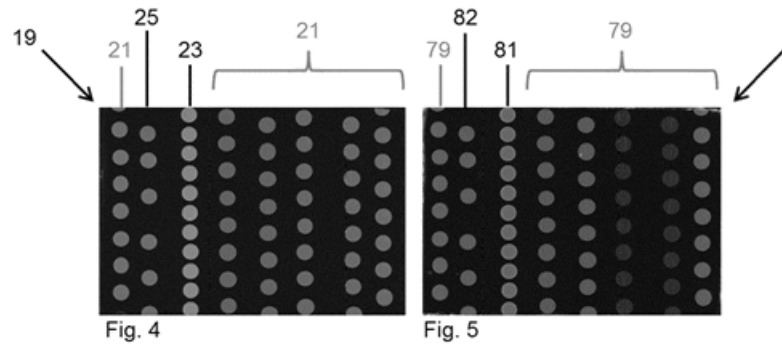


Fig. 6

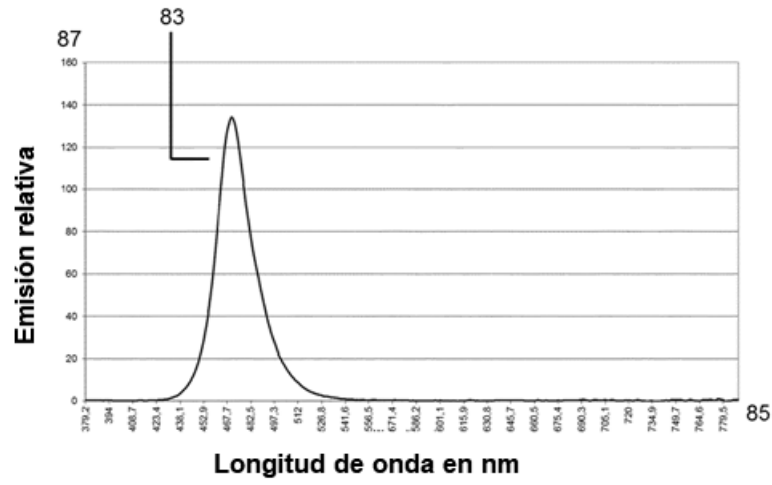


Fig. 7

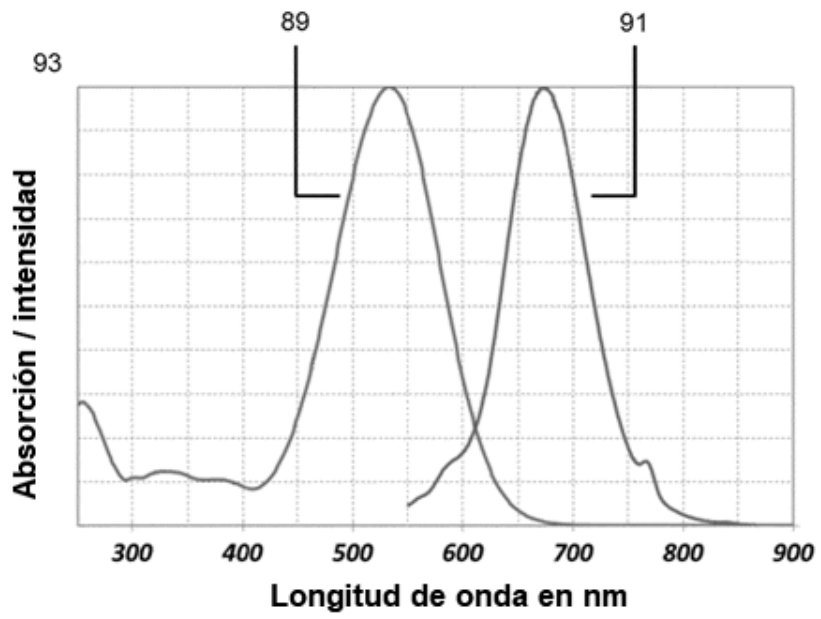


Fig. 8

