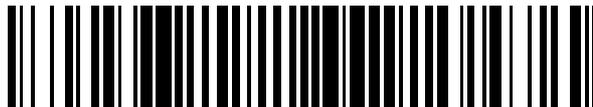


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 898**

51 Int. Cl.:

G01N 21/59 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2014 PCT/EP2014/056787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2014 E 14716274 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2989446**

54 Título: **Procedimiento de evaluación automática de tiras de inmunotransferencia incubadas**

30 Prioridad:

24.04.2013 DE 102013007045

21.05.2013 DE 102013008468

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

06.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEYER, WOLFGANG;
SCHEPER, THOMAS y
KAFFKA, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 898 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de evaluación automática de tiras de inmunotransferencia incubadas

La invención se refiere a un procedimiento para la evaluación automatizada de tiras de inmunotransferencia lineal incubadas. Es esencial para tales tiras de inmunotransferencia lineal que las mismas tengan áreas recubiertas con antígenos que se colorean para formar las denominadas bandas tan pronto como se produce la unión, en particular entre el antígeno y un anticuerpo presente en una muestra de paciente.

En el área del diagnóstico *in vitro*, las tiras de inmunotransferencia, tales como las tiras de inmunotransferencia de Western o las tiras de inmunotransferencia lineal a menudo se emplean para establecer un diagnóstico. Las tiras de inmunotransferencia requeridas respectivamente se colocan en los canales de incubación provistos para este propósito, en los cuales se incuban con los reactivos requeridos y la muestra del paciente. Después de que la prueba se ha realizado correctamente, en las muestras de pacientes con resultados positivos, las tiras de inmunotransferencia muestran coloraciones especiales, denominadas bandas, que revelan en particular la unión de anticuerpos a los antígenos proporcionados en las tiras de inmunotransferencia. La evaluación de las tiras de inmunotransferencia incubadas se puede realizar mediante una inspección visual o las tiras de inmunotransferencia se evalúan usando sistemas automatizados o al menos parcialmente automatizados. En este contexto, se conoce la llamada EU-ROBlotCamera de la compañía EUROIMMUN Medical Laboratory Diagnostics AG, que toma imágenes de las tiras de inmunotransferencia incubadas mientras las tiras aún se encuentran en los canales de incubación de una bandeja de incubación. Las imágenes correspondientes se digitalizan, se transmiten a una unidad de análisis de datos y allí se evalúan con la ayuda de un software de laboratorio especial. Mediante la evaluación de las tiras de inmunotransferencia, se determina en primer lugar la aparición de las bandas, así como la coloración de las bandas individuales en comparación con el fondo para la preparación de una propuesta de diagnóstico. Las muestras fuertemente positivas muestran regularmente una coloración fuerte en las tiras de inmunotransferencia, mientras que las muestras solo débilmente positivas a menudo solamente proporcionan señales débiles y, por lo tanto, difíciles de evaluar.

A partir del documento WO99/53288, se conoce un sistema similar en el que se describe un sistema automatizado para la evaluación de transferencias para el análisis de *Borrelia*. Aquí, también, las imágenes de las tiras de inmunotransferencia incubadas se toman con la ayuda de una cámara digital y se transmiten a una unidad de procesamiento electrónico de datos para su análisis. La coloración de las bandas en las muestras de pacientes con resultados positivos, a su vez se evalúa para su resolución de acuerdo con los niveles de color. El problema con el uso de los sistemas descritos es que a menudo se usan diferentes membranas como sustrato para la producción de tiras de inmunotransferencia. En particular, se usan membranas basadas en PVDF, nailon o nitrocelulosa. Con respecto a la generación de imágenes de las tiras de inmunotransferencia incubadas, debe observarse aquí que el comportamiento de coloración de las tiras de inmunotransferencia de diferentes membranas a menudo difiere significativamente, lo que puede ser problemático para una evaluación automatizada de las coloraciones. Además, el comportamiento de secado de los materiales mencionados anteriormente es diferente, por lo que se toman imágenes parciales de tiras de inmunotransferencia que tienen una humedad residual diferente. La humedad residual a su vez tiene una influencia directa en el color de fondo de una tira de inmunotransferencia y, por lo tanto, en la determinación de la diferencia de color entre la banda y el fondo de la tira de inmunotransferencia. Además, se debe tener en cuenta que incluso las imágenes individuales de tiras de inmunotransferencia con un tiempo de exposición fijo, con iluminación definida y/o después de un tiempo de secado fijo no siempre proporcionan una imagen óptima con respecto a la coloración del fondo o la relación entre las bandas y la coloración del fondo o habrá una sobreexposición de la imagen, que finalmente conduce a una evaluación de imagen dificultosa.

En CHEN YUZH ET AL, "Amyloid precursor protein modulates beta-catenin degradation", JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, (20071210), vol. 4, no. 1, ISSN 1742-2094, page 29, se describe un denominado procedimiento de inmunotransferencia de Western en el que se detectan reacciones de quimioluminiscencia por medio de tomas de imágenes digitales. En este caso, se detecta una pluralidad de tomas de dicha inmunotransferencia de Western, luego se usa una sola toma para realizar una densitometría o medición de densidad. Además, se describe realizar el experimento de inmunotransferencia de Western tres veces o con mayor frecuencia.

En KWON H ET AL, "Caveolin-2 regulation of STAT3 transcriptional activation in response to insulin", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1793, no. 7, doi:10.1016/J.BBAMCR.2009.04.015, ISSN 0167-4889, (20090507), pages 1325 - 1333, mediante un experimento de inmunotransferencia con coloración de quimioluminiscencia, se propone realizar varias tomas de una inmunotransferencia y representar las imágenes respectivas para las bandas individuales.

En HOLMSETH S ET AL, "The concentrations and distributions of three C-terminal variants of the GLT1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter protein in rat brain tissue suggest differential regulation", NEUROSCIENCE; [1068-7971], NEW YORK, NY, US, vol. 162, no. 4, ISSN 0306-4522, (20090915), pages 1055 - 1071, mediante un

procedimiento de inmunotransferencia con coloración de quimioluminiscencia, se propone adquirir datos de imagen y obtener diferentes tomas de una misma inmunotransferencia de Western.

En SLADEK C D ET AL, "Characterization of nuclear neurokinin 3 receptor expression in rat brain", NEUROSCIENCE; [1068-7971], NEW YORK, NY, US, vol. 196, doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.08.044, ISSN 0306-4522, (20110819), pages 35 - 48, se propone registrar múltiples tomas de la inmunotransferencia de Western y realizar una evaluación de la densidad óptica mediante software.

En Ahmed Elbaggari ET AL, "Imaging of Chemiluminescent Western Blots: Comparison of Digital Imaging and X-ray Film", Bio-Rad Tech Note 5809, (20080101), URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/Literature/Bulletin_5809.pdf, (20140627), se sugiere, en los procesos de inmunotransferencia de Western en los que se puede detectar una decoloración por quimioluminiscencia mediante un material de película, obtener imágenes del resultado de la inmunotransferencia y luego analizar estas películas después de su desarrollo mediante un procedimiento de imagen o un dispositivo de imagen con respecto a la densidad óptica. En este caso, también se propone realizar múltiples tomas para un resultado de inmunotransferencia que tiene señales débiles y fuertes.

Sobre la base de los sistemas conocidos para las evaluaciones automatizadas de tiras de inmunotransferencia y los problemas descritos anteriormente, la invención se basa en el objetivo de ofrecer un sistema que posibilite una evaluación cualitativa de alta calidad de las tiras de inmunotransferencia lineal. Se pretende garantizar la solución técnica de acuerdo con la invención de que, en particular, la relación entre la coloración de las bandas individuales y la coloración de fondo permite una evaluación confiable y el riesgo de la denominada sobreexposición se excluye en gran medida. El procedimiento mejorado también debería integrarse fácilmente en el proceso de laboratorio conocido y poder implementarse con medios relativamente simples.

El objeto descrito anteriormente se logra por medio de un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. Las realizaciones ventajosas de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes y se explican con más detalle en la siguiente descripción con referencia parcial a las figuras.

De acuerdo con la invención, es un procedimiento para la evaluación automatizada de una tira de inmunotransferencia lineal incubada, en la que se toman imágenes con una cámara al menos regionalmente desde una superficie de una tira de inmunotransferencia lineal con fragmentos de prueba individuales montadas en ella, en la que se disponen antígenos, en particular de las denominadas bandas coloreadas, y las imágenes se transmiten a una unidad de evaluación, en la que se detecta una coloración de las tiras de inmunotransferencia lineal en las áreas de aplicación de los antígenos y sobre la base de las coloraciones detectadas se genera una propuesta de diagnóstico, en la que con la cámara se realizan al menos dos tomas en diferentes momentos con diferentes tiempos de exposición, se filtran las tomas óptimas para las piezas de prueba individuales y se usa como una imagen global optimizada de una inmunotransferencia lineal incubada para generar la propuesta de diagnóstico.

En una realización preferida, las al menos dos tomas comprenden una primera y una última toma en diferentes momentos, opcionalmente tomas adicionales entre ellas, siendo el intervalo de tiempo entre la primera y la última toma al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 90, 100, 120, 150 o 180 minutos, más preferiblemente al menos 5, 10 o 15, más preferiblemente al menos 5 minutos.

Por lo tanto, es esencial para el procedimiento de acuerdo con la invención que las condiciones bajo las cuales se realizan las tomas individuales de las bandas de la tira de inmunotransferencia lineal varíen y finalmente se usen las tomas más adecuadas para generar una propuesta de diagnóstico. En el marco de la evaluación, una tira de inmunotransferencia se ensambla virtualmente según sea necesario a partir de las imágenes más adecuadas de las diversas tomas. Las imágenes usadas de las bandas coloreadas para la generación de una propuesta de diagnóstico pueden originarse de una o varias tomas. El cambio en las condiciones de la toma puede consistir en que se realicen diferentes tomas en diferentes momentos, en particular a diferentes tiempos de secado.

De acuerdo con la invención, se infiere que se lleven a cabo al menos dos tomas de la superficie recubierta con antígeno de una tira de inmunotransferencia lineal, en la que difieren los tiempos de exposición de las diferentes tomas. Particularmente preferentemente, se llevan a cabo al menos dos tomas de al menos dos tiras de inmunotransferencia lineal.

En cualquier caso, las diferentes tomas se transmiten a la unidad de evaluación, en la que la coloración de las regiones individuales, las denominadas bandas, se compara con la coloración de fondo de la franja de la línea asociada y se clasifica por medio de una escala de gradación de color con valores enteros de 0 a 255. Primero, se comparan entre sí las diferentes tomas y se usan las tomas respectivas de las tiras de inmunotransferencia lineal para la generación de una propuesta de diagnóstico, cuya diferencia de color entre las bandas individuales y el fondo de las tiras es particularmente grande. Se da particular preferencia al uso de de las tomas claras.

En la unidad de evaluación, de las diferentes tomas se filtran las óptimas para usarlas para la generación de la propuesta de diagnóstico. En este contexto, es concebible que para transferencias lineales o chips de membrana con piezas de prueba individuales dispuestas en ellas, se determine la toma óptima de la coloración para cada pieza de prueba. Por lo tanto, las bandas de una tira que son más adecuadas para la evaluación siempre se filtran primero y estas bandas se tienen en cuenta para la generación automatizada de una propuesta de diagnóstico. En este contexto, se proporciona que se comparen las tomas individuales de las bandas de una tira de inmunotransferencia lineal y que la mejor toma de una banda respectivamente se utilice para generar una propuesta de diagnóstico. Según esta realización, es concebible que, durante la preparación de una propuesta de diagnóstico, se tenga en cuenta una tira de inmunotransferencia casi virtual, que consiste en tomas de bandas que se han tomado en diferentes momentos y con diferentes tiempos de exposición. Con la ayuda de esta medida, es posible usar una pluralidad de tomas en diferentes momentos y las mejores tomas para la preparación de una propuesta de diagnóstico. La calidad en la generación de una propuesta de diagnóstico se incrementa así significativamente.

Además de la variación del tiempo de exposición de al menos dos tomas, también es concebible producir diferentes tomas con diferente brillo o iluminación de la tira de inmunotransferencia. Otra idea importante es generar varias tomas y, en última instancia, usar las que sean más adecuadas para la evaluación, posiblemente incluyendo diferentes bandas de diferentes tomas. En una realización preferida, el brillo, preferiblemente expresado como iluminancia, difiere entre la imagen con el brillo más alto y la imagen con el brillo más bajo entre al menos dos imágenes en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% del brillo de la toma con el brillo más bajo.

De acuerdo con un desarrollo específico, se realizan al menos dos tomas en tiempos de exposición entre 20 y 50 milisegundos.

En este contexto, se menciona expresamente que el procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para la evaluación de tiras de inmunotransferencia lineal.

En lo siguiente, la invención sin restricción del concepto inventivo general se explicará con más detalle usando una realización de ejemplo con la ayuda de una figura. Se muestra:

Figura: Bandeja de incubación con múltiples canales de incubación que contienen tiras de inmunotransferencia lineal incubadas que se registran con la ayuda de una cámara digital.

La figura muestra una cámara 2 dispuesta por encima de una bandeja de incubación de 3, que tiene múltiples canales de incubación 4, la que toma imágenes de las tiras de inmunotransferencia lineal 5 dispuestas en los canales 4 y las transmite en forma digital a una unidad de evaluación 1. Las tiras de inmunotransferencia lineal 5 dispuestas en los canales 4 ya se han incubado y ya se han secado al menos parcialmente. Se puede ver claramente que las diferentes tiras de inmunotransferencia lineal 5 tienen coloración en forma de bandas 6 en diferentes posiciones. En estas posiciones se encuentran antígenos en la superficie de las tiras de prueba 5 que muestran una reacción positiva con anticuerpos de una muestra de paciente analizada. De esta manera, se puede generar una propuesta de diagnóstico, que proporciona información sobre la probabilidad de que un paciente sufra de una enfermedad en particular. Se señala expresamente que es irrelevante para el procedimiento llevado a cabo si se llena solamente un canal de incubación con una tira de inmunotransferencia o si hay tiras de inmunotransferencia en al menos dos canales. Por lo general, varios canales de una bandeja de incubación ya están ocupados con tiras de inmunotransferencia lineal debido a aspectos económicos y comerciales, y estos se incuban y se analizan a la vez.

La evaluación de la tira de inmunotransferencia lineal 5 incubada se automatiza con la ayuda de una cámara 2 digital. La cámara 2 digital realiza sucesivamente un total de cinco tomas de la superficie de la tira de inmunotransferencia lineal 5 ubicadas en los canales 4, que difieren con respecto al tiempo de exposición. Las tomas se realizan con un tiempo de exposición de 21, 28, 35, 42 y 49 ms. De cada tira de inmunotransferencia lineal 5 incubada, ubicada en un canal de incubación 4, se transmiten finalmente cinco tomas digitalizadas a la unidad de evaluación 1. En la unidad de evaluación 1, se determina la coloración de las bandas individuales en comparación con la coloración del fondo 7 para las diversas tomas, y a cada una de estas bandas se le asigna un valor numérico que representa el nivel de color respectivo, que es un número entero y se encuentra entre 0 y 255.

En un paso siguiente, se seleccionan las bandas 6 de las tiras de inmunotransferencia lineal 5 individuales que muestran la coloración más clara en comparación con el fondo 7. Con respecto a las tiras de inmunotransferencia lineal 5 finalmente se seleccionan las mejores tomas, es decir, la diferencia de color más distintiva de una banda 6 con respecto al fondo 7 respectivo, en la que las diferentes tomas seleccionadas se realizan en diferentes momentos y, en este caso, a diferentes tiempos de exposición. Las imágenes de las coloraciones de la banda se filtran a medida que las tomas óptimas se evalúan finalmente con la ayuda de un software de laboratorio electrónico y, por lo tanto, se genera una propuesta de diagnóstico. Mediante el procedimiento descrito, es posible, cuando se usan transferencias lineales con chips de membrana que llevan antígenos aplicados individualmente, filtrar las tomas óptimas de los chips de membrana individuales y, como una imagen general casi optimizada de una tira de

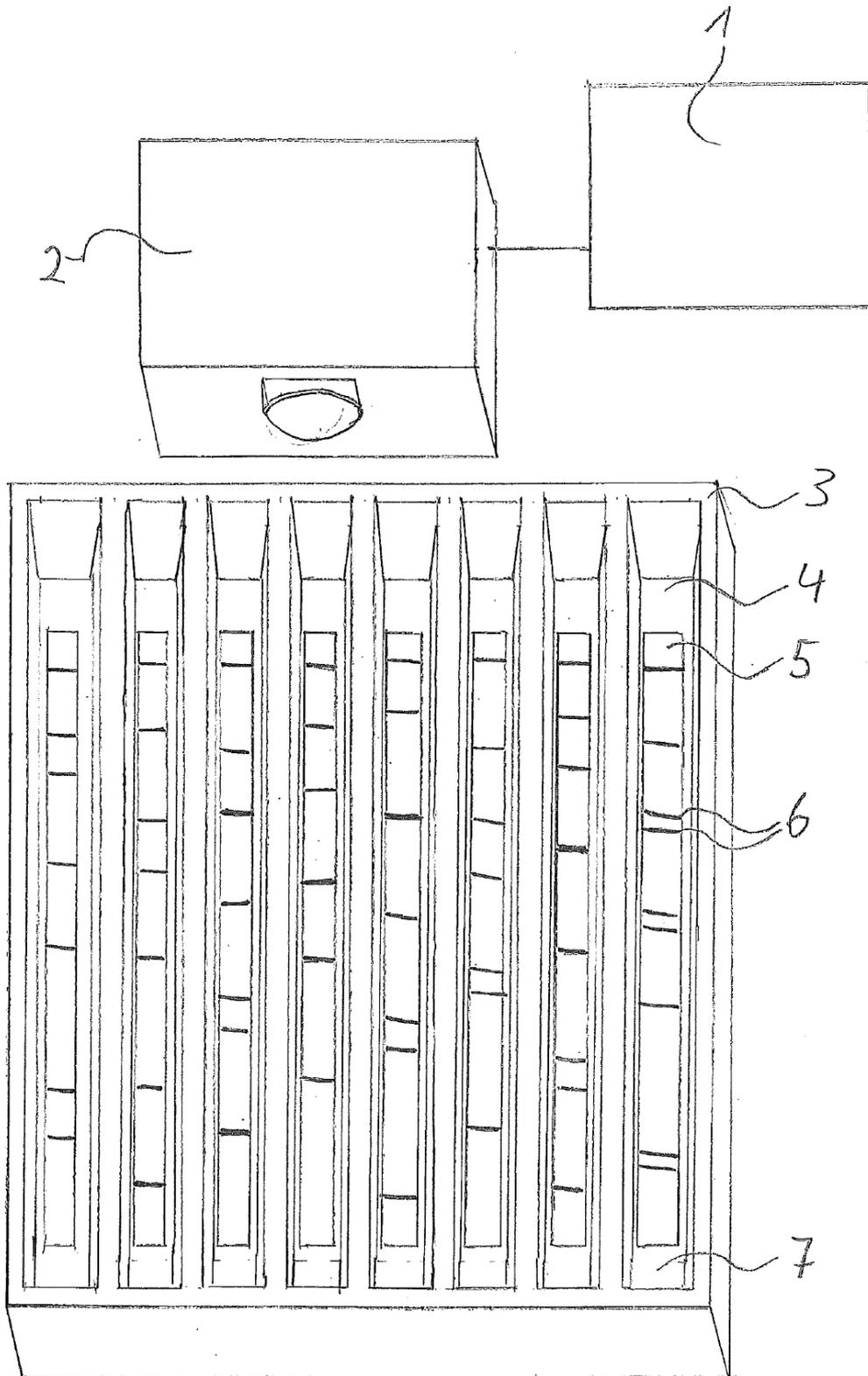
inmunotransferencia incubada, establecer una propuesta de diagnóstico sobre la base de una tira de inmunotransferencia incubada.

Lista de referencias

- 1 Unidad de evaluación
- 5 2 Cámara
- 3 Bandeja de incubación
- 4 Canal de incubación
- 5 Tiras de inmunotransferencia incubadas
- 6 Banda
- 10 7 Fondo

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de análisis automática de una tira de inmunotransferencia lineal incubada que comprende fragmentos de pruebas individuales adheridas, en donde las imágenes al menos de ciertas zonas de una superficie de la tira de inmunotransferencia sobre las cuales están aplicados los antígenos son registradas por una cámara (2) y las imágenes son transmitidas a una unidad de evaluación (1) en la cual se detecta una decoloración de la tira de inmunotransferencia lineal en las zonas de aplicación de los antígenos y se genera una propuesta de diagnóstico sobre la base de la decoloración detectada, **caracterizado porque** la cámara (2) toma cada vez al menos dos imágenes en momentos diferentes y con tiempos de exposición diferentes, y **porque** las tomas óptimas respectivas de los fragmentos individuales son filtradas y consideradas como una imagen global optimizada de una tira de inmunotransferencia incubada que se usa como base para la generación de una propuesta de diagnóstico.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se realizan cinco tomas con tiempos de exposición diferentes.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** las al menos dos tomas se registran con tiempos de exposición de entre 20 y 50 ms.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se determina una diferencia de color con respecto al fondo (7) de las áreas de aplicación de los antígenos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** la diferencia de color se clasifica en niveles enteros entre 0 y 255.



Figura