



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 956**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04811125 .6**

96 Fecha de presentación : **17.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1706836**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Método y sistema para analizar reacciones usando un sistema de información.**

30 Prioridad: **06.12.2003 US 527389 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2011**

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**  
**Dept. 377, Bldg Ap6A-1 100 Abbott Park Road**  
**Abbott Park, Illinois 60064-6008, US**

72 Inventor/es: **Clemens, John, M.;**  
**Shain, Eric, B.;**  
**Jeng, Tzyy-Wen y**  
**Schneider, George, J.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 357 956 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

Método y sistema para analizar reacciones usando un sistema de información

## AVISO SOBRE DERECHOS DE AUTOR

5 De acuerdo con el título 37 de C.F.R. 1.71 (e), los solicitantes advierten que esta revelación contiene materiales que están sujetos a protección de derechos de autor y para los cual se reivindicán, tal como, pero sin limitarse a estos, listados de código fuente, capturas de pantalla, interfaces de usuario, instrucciones de usuario, y cualesquiera otros aspectos de esta presentación para la cual está, o puede estar, disponible la protección de derechos de autor en cualquier jurisdicción. El propietario de los derechos de autor no tiene ninguna objeción a la reproducción facsímil por cualquier persona del documento de patente o la revelación de la patente, como aparece en los registros de la Oficina de Patentes y Marcas Comerciales. Se reservan cualesquiera otros derechos, y cualquier otra reproducción, distribución, creación de trabajos derivados basados en los contenidos, la presentación pública, y la representación pública de la solicitud o cualquier parte de la misma están prohibidas por las leyes de derechos de autor aplicables

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 1. CAMPO DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere al análisis de datos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Más específicamente, la invención se refiere a un sistema de información y un método para realizar determinaciones relativas a reacciones químicas y/o biológicas. La invención también involucra un método alternativo de cuantificación de ácidos nucleicos en una muestra que comprende amplificación de un ácido nucleico objetivo y el análisis de los datos obtenidos durante la reacción de amplificación. La invención involucra además un sistema de diagnóstico y/o un kit que usa la amplificación de ácido nucleico en tiempo real, incluyendo el análisis de PCR pero sin limitarse a éste.

## 2. DISCUSION DE LA TECNICA

25 En muchos diferentes campos industrial, médico, biológico y/o de investigación, es deseable determinar la cantidad de un ácido nucleico de interés. Algunos métodos de cuantificación de los ácidos nucleicos de interés involucran la amplificación de los mismos y la observación de una señal proporcional a la cantidad de productos amplificados producidos; otros métodos involucran la generación de una señal en respuesta a la presencia de un ácido nucleico objetivo, cuya señal se acumula sobre la duración de la reacción de amplificación. Como se usa en este documento, la reacción de amplificación del ácido nucleico se refiere tanto a la amplificación de una porción de la secuencia de un ácido nucleico objetivo como a la amplificación y acumulación de la señal indicativa de la presencia de ácido nucleico objetivo, prefiriéndose frecuentemente la primera a la última. La cuantificación de los ácidos nucleicos se hace más difícil o menos precisa, o ambas cosas, debido a que los datos capturados durante las reacciones de amplificación frecuentemente se obscurecen significativamente por señales que no se generan en respuesta al ácido nucleico objetivo (es decir, el ruido). Además, los datos capturados por muchos métodos de supervisión pueden estar sujetos a variaciones y falta de reproductibilidad debidas a condiciones que pueden cambiar durante una reacción o cambiar entre los diferentes instantes de una reacción. A la vista de lo anterior, existe una necesidad de desarrollar medios mejorados de cuantificación de ácido nucleico. Cuando se activa la cuantificación de los ácidos nucleicos por reacciones de amplificación, también existe una necesidad de mejorar los métodos actuales de detección de reacciones de amplificación sospechosas o inválidas. Queda además una necesidad de mejorar las capacidades actuales para distinguir entre las reacciones de amplificación que no detectan un ácido nucleico objetivo (es decir, reacciones negativas) a partir de señales débiles obtenidas de reacciones de amplificación que sufren de bajas cantidades de un ácido nucleico en una muestra, o un grado de inhibición de la reacción de amplificación, u otras causas. La presente invención proporciona mejoras en estas áreas como se trata más adelante.

A continuación sigue una lista no exhaustiva de referencias que proporcionan información de antecedentes con respecto a la presente invención:

50 Análisis de Datos de Relativos a la Expresión de Genes Usando PCR Cuantitativa en Tiempo Real y el Método 22DDCT, en METHODS 25: 402-208 (2001) doc: 10.1006/método 2001. 1262 de Livak, k y Schmittgen, T.

Cuantificación absoluta de mRNA usando ensayos de PCR de transcripción inversa en tiempo real, Diario de Endocrinología Molecular 25: 169-193 (2000) de Bustin SA.

55 Cuantificación de mRNA usando una PCR de transcripción inversa en tiempo real: tendencias y problemas, Diario de Endocrinología Molecular 29: 23-29 (2002) de Bustin SA.

Aunque los inventores no pueden garantizar que la siguiente página Web permanecerá

disponible y no necesariamente avalen cualesquiera opiniones expresadas en la misma, una persona interesada puede desear referirse a la página Web [www.wzw.turn.de/gene-quantification/index.shtml](http://www.wzw.turn.de/gene-quantification/index.shtml) para información útil de antecedentes.

5 La discusión de cualesquiera obras, publicaciones, ventas o actividad en cualquier parte en esta presentación, incluyendo cualesquiera documentos presentados con esta solicitud, no pretende ser un reconocimiento en ningún modo de cualquiera de tales trabajos que constituye la técnica anterior, a menos que se especifique lo contrario. De forma similar, la discusión de cualquier actividad, trabajo o publicación en este documento no es un reconocimiento de que tal actividad, trabajo o publicación se conozca en cualquier jurisdicción particular.

10 La PCR en tiempo real es una reacción de amplificación usada para la cuantificación de ácidos nucleicos objetivos en una muestra de test.

15 Convencionalmente, los técnicos especialistas típicamente ven la reacción de amplificación comprendida en tres fases distintas. En primer lugar hay una fase de fondo o de línea base, en la cual el ácido nucleico objetivo se está amplificando pero la señal proporcional a la cantidad de ácido nucleico objetivo no puede detectarse porque es demasiado pequeña para ser observada con relación a señales independientes del objetivo (a veces llamado "fondo" o "señal de fondo"). A continuación, hay una fase logarítmica en la cual la señal crece sustancialmente de modo logarítmico porque la señal es sustancialmente proporcional a la cantidad de ácido nucleico objetivo en la reacción de amplificación y es mayor que la señal de fondo. Finalmente, el crecimiento en la señal se ralentiza durante una fase "plana" reflejando una fase de amplificación menor que la amplificación logarítmica del ácido nucleico objetivo. Como es sabido en la técnica, el tiempo en el cual la fase logarítmica cruza un valor umbral, que es un valor algo mayor que el valor de la señal de fondo, está relacionada de forma reproducible con el logaritmo de la concentración del ácido nucleico objetivo. Este método de la técnica anterior se denomina de forma genérica como el método  $C_t$ , quizás llamado de esta forma por el Ciclo en el cual la señal cruza el umbral. El análisis de  $C_t$  es razonablemente reproducible y preciso, pero sufre de algunos inconvenientes, que no necesitan tratarse en este punto para entender la presente invención.

25 La Patente de los Estados Unidos N° 6.303.305 desvela un método de cuantificación de ácidos nucleicos que emplea reacciones PCR. El método desvelado emplea la derivada enésima de la curva de crecimiento de una reacción de amplificación de ácido nucleico fluorescente. El método evita de forma eficaz la necesidad de realizar una corrección de la línea base, pero no proporciona ningún método fiable de determinación entre muestras reactivas y muestras no reactivas, y no sugiere razonablemente cómo usar el cálculo de la derivada enésima para evaluar la validez de los resultados obtenidos. Además, las señales de amplificación del ácido nucleico resultantes de cualesquiera artefactos en el sistema (por ejemplo, el acoplamiento o el solapamiento positivo – definido como *infra*) no pueden distinguirse de las respuestas positivas verdaderas usando los métodos desvelados en la misma y pueden conducir a falsos resultados positivos. Sin embargo, el cálculo de la primera derivada descrita por la Patente de los Estados Unidos N° 6.303.305 proporciona un valor relacionado con la eficacia que es útil en el contexto de la presente invención. Los técnicos especialistas pueden referirse a la Patente de los Estados Unidos N° 6.303.305 para detalles adicionales relativos al cálculo de la primera derivada de la curva de crecimiento de la señal de amplificación del ácido nucleico.

30 Sin embargo, la Patente de los Estados Unidos N° 6.303.305 no describe ni sugiere el uso de este valor relacionado con la eficacia, descrito en esta descripción (más adelante).

35 La Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos copropiedad N° 60/527.389, presentada el 6 de diciembre de 2003, describe un método para analizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en la cual se examina el logaritmo de la señal de una reacción de amplificación en busca de la pendiente o gradiente máximo. Este valor, que para cualquier conjunto de datos corresponde con un punto en cierto periodo de tiempo o número de ciclos después de la iniciación de la reacción de amplificación, se llama MGL de la reacción. MGL es útil en ciertas realizaciones de la presente invención, particularmente en aquellas que distinguen cualitativamente entre las muestras que comprenden un poco del ácido nucleico objetivo y las muestras que no contienen ácido nucleico objetivo.

40 El documento EP-A-1 138 783 describe la determinación de la concentración de objetivo a partir de una reacción PCR en tiempo real usando un valor predeterminado de la eficacia de la reacción. Esta eficacia de la reacción predeterminada se genera preparando una serie de diluciones de objetivo y calculando el valor de la eficacia bien a partir del ajuste de una función a la serie de diluciones logaritmo-lineal y tomando una derivada o ajustando una línea a los datos de la serie de diluciones logaritmo-lineal y calculando la eficacia a partir de la pendiente.

45 El documento EP-A-1 138 784 describe los valores de la eficacia de la reacción. Esta eficacia se predetermina preparando una serie de disoluciones de objetivo y calculando el valor de la eficacia bien a partir del ajuste de una función a la serie de diluciones logaritmo-lineal y tomando una derivada, o ajustando una línea a la serie de diluciones logaritmo-lineal y tomando una derivada, o ajustando una línea a los datos de la serie de diluciones logaritmo-lineal y calculando la eficacia a partir de la pendiente.

El documento EP-A-1 041 158 describe la toma de la señal de amplificación y a continuación la toma de la primera, la segunda o la *n*-ésima derivada y uso a continuación del máximo, el mínimo o el cruce por cero de la respuesta transformada para generar un número de ciclo.

5 El documento EP-A-0 686 699 describe el ajuste de una curva de una ecuación para todos los datos de la amplificación. La ecuación particular intenta modelar las condiciones de la reacción PCR primaria. Se varían varios coeficientes en el modelo para proporcionar un mejor ajuste a través de todos los datos. El resultado de este ajuste es que la concentración molar de objetivo al comienzo de la reacción se estima sin necesidad de correr normativas externas. Los parámetros  $e_s$  y  $e_v$  son una medida de la eficacia de partes de la reacción.

## 10 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define en la reivindicación 1 y proporciona un método para determinar si una muestra contiene un ácido nucleico de interés, para cuantificar este ácido nucleico, y para evaluar la validez de la calidad de los datos utilizados para alcanzar las determinaciones cualitativas y cuantitativas anteriores.

15 El método de esta invención comprende poner en contacto una muestra con reactivos de amplificación o detección o ambos para amplificar el ácido nucleico (como se usa el término "amplificado" en este documento). La reacción de amplificación genera señales indicativas de la cantidad de ácido nucleico objetivo presente en la muestra, cuyas señales se registran en numerosos puntos durante la reacción de amplificación. La señal puede medirse y registrarse como una función del valor del tiempo, o  
20 en alternativa, el número de ciclo.

Se determinan "transformadas relacionadas con la eficacia" adecuadas vistas o calculadas como una función del tiempo para la reacción de amplificación, y el punto en la reacción de amplificación del máximo de la transformada relacionada con la eficacia, la magnitud del máximo de la transformada relacionada con la eficacia, o el ancho (o parámetro similar) de un pico en la representación de la transformada relacionada con la eficacia como una función del tiempo puede usarse para obtener información acerca de la reacción. Este punto en la reacción representa el punto en el tiempo o el ciclo de amplificación en el cual se produce el máximo de la transformada relacionada con la eficacia. Ventajosamente, el máximo de la transformada relacionada con la eficacia para una reacción particular, así como la duración y la magnitud de los cambios sustanciales en la transformada relacionada con la eficacia calculada, tienen relaciones reproducibles de forma consistente con la concentración inicial de un ácido nucleico objetivo en una muestra, con la fiabilidad de los datos y la información generada por el ensayo, con la presencia o ausencia de ácido nucleico objetivo *de buena fe*, y con otros parámetros de la reacción. Ventajosamente, estas asociaciones se mantienen incluso en presencia de un ruido sustancial y variaciones impredecibles en la señal generada por la reacción de amplificación. Como se usa en este documento, el término "máximo", cuando se aplica a las transformadas relacionadas con la eficacia, se pretende incluir el mínimo de la transformada relacionada con la eficacia cuando se usa la inversa de la transformada relacionada con la eficacia. Puede usarse la proporción inversa, en la cual, en el caso de una curva, la curva empezará en un valor de aproximadamente 1 en la región de la línea base, disminuirá durante la región de crecimiento, y volverá aproximadamente a 1 en la región plana. El uso de esta transformada permitiría usar la magnitud y la posición de la depresión en lugar de la magnitud y posición del pico para el análisis. Esta transformada se implementa de un modo que es esencialmente equivalente al método de la proporción en el cual se emplea el máximo de la transformada relacionada con la eficacia para una reacción particular.

45 En todas las realizaciones, las señales de la reacción de amplificación se miden a intervalos de tiempo apropiados para la reacción de amplificación durante la reacción de amplificación. Estas señales pueden denominarse como mediciones basadas en el tiempo o periódicas, de modo que cada medición de la señal generada para una reacción particular puede expresarse como una función del tiempo. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es cíclica (por ejemplo, como en la PCR). Debido a que los ciclos a menudo tienen una duración sustancialmente uniforme, es frecuentemente conveniente sustituir un "número de ciclo" por una medición de tiempo. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente invención, como se describe en este documento, una región de datos, identificada por uno o más métodos sobre un sistema de procesamiento de información, puede corresponder a un número de ciclo. Sin embargo, algunas reacciones de amplificación cíclicas tienen ciclos de duración no uniforme. Para estas reacciones de amplificación, puede ser preferible medir el tiempo en las mediciones no uniformes. Por ejemplo, la extensión teórica de la amplificación en una reacción PCR que tiene ciclos de duración variables estará enlazada más directamente con el número de ciclos realizados que con la duración de la reacción. Por consiguiente los técnicos especialistas fácilmente apreciarán que las mediciones basadas en el tiempo pueden fácilmente ponerse a escala para reflejar la reacción de amplificación subyacente. Como es sabido en la técnica, a menudo es útil interpolar los datos y resultados entre números de ciclos, lo cual da lugar al concepto de un número de ciclo fraccional "FCN". De forma similar, en las reacciones donde las mediciones están basadas en el tiempo, los eventos pueden medirse en unidades fraccionales de tiempo.

En realizaciones adicionales, la invención involucra ventajosamente un sistema o un método o ambos para analizar una muestra de reacción, tal como una muestra de reacción PCR, que usa un conjunto sustancial de datos de la cinética de la reacción disponibles para identificar una región de interés, en lugar de usar un conjunto de datos muy limitado, tal como cuando una curva de reacción cruza un umbral.

En ciertas realizaciones, puede usarse una región identificada para determinar uno o más resultados cualitativos, o resultados de análisis cuantitativos de los datos, o ambos. El punto de la reacción del máximo de la transformada relacionada con la eficacia puede usarse para determinar la concentración de ácido nucleico objetivo en la muestra o para determinar cualitativamente si está presente algún analito objetivo en una muestra de test. Estos y otros valores pueden compararse con cantidades de referencia en general del mismo modo que pueden usarse un número de ciclo umbral ( $C_t$ ) o un número de ciclo umbral fraccional en la técnica anterior.

El punto de reacción correspondiente al máximo de la transformada relacionada con la eficacia puede entenderse como indicativo o deducirse de un número de ciclo que está localizado en un punto relativamente consistente con respecto a la eficacia de la reacción, tal como en un máximo de la eficacia de la reacción o una región relacionada consistentemente con un máximo de la eficacia de la reacción o relacionada consistentemente con alguna otra progresión de la reacción. Pueden usarse diferentes métodos para determinar un punto de la reacción relacionado con un máximo de la eficacia de la reacción. Este valor puede comprender valores de FCN ajustados (por ejemplo,  $FCN_{MR}$  Ajustado y  $FCN_{Intensidad}$  Ajustado) como se describen más adelante. En ciertas realizaciones de esta invención, los métodos de la invención pueden determinar valores de FCN para señales de reacción múltiples, tales como un objetivo y/o un control y uso de esos valores en la determinación de parámetros de reacción, incluyendo pero sin limitarse a estos, la cantidad de ácido nucleico objetivo inicialmente presente en una muestra y la validez de los resultados generados por una reacción de amplificación.

La presente invención puede identificar un valor indicativo de la eficacia de la reacción (a veces, en este documento, generalmente denominado como "valor relacionado con la eficacia" (ERV) en una o más regiones sobre una curva de crecimiento de señal. Un valor relacionado con una eficacia específica se denomina como un valor de MaxProporción o MR. La MaxProporción se refiere a un posible método para calcular un valor relacionado con la eficacia como se trata adicionalmente en este documento. Este es un ejemplo de un método para determinar un ERV pero en los ejemplos ilustrativos en este documento que se refieren a la MR debería entenderse incluido el máximo de la derivada primera de la señal obtenida a partir de la reacción de amplificación (por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 6.303.305).

De este modo, esta invención está involucrada con un método analítico que identifica dos valores para una curva de reacción: (1) un valor relacionado con un número de ciclo o valor del tiempo y (2) un valor que indica un valor relacionado con la eficacia. La invención puede usar estos dos valores en el análisis de los datos de reacción realizada usando un sistema de manejo de información y un método de uso del sistema. Un ejemplo de dos de tales valores son las realizaciones específicas de FCN y MR tratadas más adelante.

Esta invención está también relacionada con un método y un sistema que usa dos valores como se ha descrito anteriormente que se determinan a partir de una reacción bajo examen al comparar esa reacción con uno o más conjuntos de datos de criterios. Puede usarse un criterio de comparación para determinar y/o corregir cualesquiera resultados y/o cuantificaciones como se describe en este documento. Los datos de criterios pueden deducirse generando pares de valores relacionados con el número de ciclo – valores relacionados con la eficacia (por ejemplo, pares FCN-MR) a partir de múltiples reacciones de calibración de cantidad conocida o concentración conocida o ambos.

Esta invención también involucra una o más técnicas para la realización de análisis de los datos de la reacción. Este análisis puede usarse separadamente o conjuntamente con el análisis del valor relacionado con el número de ciclo – valor relacionado con la eficacia, tratado en este documento. El análisis de la eficacia puede usarse para encontrar una región de interés para realizar una determinación acerca de los datos de reacción, tales como, para la comparación con los conjuntos de datos de calibración, de forma similar al análisis de  $C_t$  como se entiende en la técnica.

La presente invención también proporciona un método para el análisis de una reacción de amplificación de ácido nucleico, en la cual una muestra que contiene un ácido nucleico se pone en contacto con agentes de amplificación y se coloca bajo condiciones de amplificación adecuadas para amplificar una porción del ácido nucleico en la muestra. Durante la reacción de amplificación, las señales que son proporcionales a la cantidad de ácido nucleico objetivo presente se miden periódicamente a intervalos adecuados. Convencionalmente, el intervalo puede corresponder con la duración de un ciclo para las reacciones de amplificación que son cíclicas. Las señales se manipulan a continuación para determinar una transformada relacionada con la eficacia para la reacción de amplificación. Las transformadas relacionadas con la eficacia en el contexto de la presente invención incluyen la pendiente

de la línea, que puede determinarse por la primera derivada de una línea ajustada a la curva de crecimiento de la señal de reacción. Cuando la transformada relacionada con la eficacia para la reacción es conocida, la representación de la transformada relacionada con la eficacia como una función del tiempo (preferiblemente expresada en las unidades utilizadas para la medición de la señal) (o la manipulación matemática que obtiene una información similar a la representación) puede usarse para identificar un valor de pico. Sin embargo, no se requiere una representación. El ancho del pico en el intervalo seleccionado de los anchos de pico aceptables puede determinarse por cualquier técnica o método aceptables. Sin embargo, un método preferido para la determinación del ancho de pico aceptable involucra analizar estadísticamente el grado de la varianza en los anchos de pico obtenidos a partir de las reacciones de amplificación objetivamente normales que son muy similares o incluso idénticas al método de amplificación analizado por el método de esta invención. En la reacción analizada, habitualmente se usa una muestra de test desconocida en lugar de las muestras usadas para caracterizar la reacción de amplificación o un ensayo de analito. Si el ancho del pico de la reacción de amplificación analizada cae dentro del intervalo prescrito de anchos de pico aceptables, la reacción se declara normal, si el ancho de pico de la reacción de amplificación analizada no cae dentro del intervalo prescrito de anchos de pico aceptables, la reacción se identifica como una reacción que está proporcionando señales sup-óptimas, aberrantes, o de otro modo cuestionables. Se evalúa el ancho de la mitad delantera del pico de la transformada relacionada con la eficacia. Esta evaluación es una medición más indulgente de la validez de la reacción de amplificación, y por lo tanto puede ser preferida en muchos casos, pero no en todos los casos en general.

La invención involucra además un sistema de información y/o programa capaces de analizar los datos capturados. Los datos pueden capturarse como datos de imagen a partir de características observables de los datos, y el sistema de información puede estar integrado con otros componentes para la captura, preparación, y/o representación de datos de la muestra. Ejemplos representativos de sistemas en los cuales puede emplearse la invención incluyen pero sin limitarse a estos, los sistemas BioRad® i-Cycler®, Stratagene® MX4000®, y ABI Prism 7000®. De forma similar, la presente invención proporciona un producto de ordenador capaz de ejecutar el método de esta invención.

Diversas realizaciones de la presente invención proporcionan métodos y/o sistemas que pueden implementarse sobre un sistema de manejo de información de propósito general o de propósito especial por medio de un lenguaje de programación adecuado, tal como Java, C++, C#, Cobol, C, Pascal, Fortran, PL1, LISP, ensamblador, etc., y cualesquiera de las especificaciones de datos o de formato adecuados, tales como HTML, XML, dHTML, TIFF, JPEG, texto delimitado por tabuladores, binario, etc. Para facilidad de tratamiento, diversos comandos software de ordenador, útiles en el contexto de la presente invención se ilustran en los comandos MATLAB®. El software MATLAB es un manipulador de álgebra lineal y un paquete de visor comercialmente disponible en The Mathworks, Natick, Massachusetts (USA). Por supuesto, en cualquier implementación particular (como en cualquier proyecto de desarrollo software) pueden realizarse numerosas decisiones específicas de la implementación para conseguir los objetivos específicos del desarrollador, tales como el cumplimiento con restricciones relacionadas con el sistema y/o relacionadas con la aplicación, que variarán de una implementación a otra. Además, se apreciará que tal esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y emplear tiempo, pero sin embargo sería una rutina que emprendería una ingeniería de software por los especialistas en la técnica que tienen el beneficio de esta revelación.

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes dibujos y descripciones detalladas. Para propósitos de claridad, esta discusión se refiere a dispositivos, métodos y conceptos en términos de ejemplos específicos. Sin embargo, la invención y los aspectos de la misma pueden tener aplicaciones en una diversidad de tipos de dispositivos y sistemas.

Además, es bien conocido que los sistemas lógicos y los métodos como los descritos en este documento pueden incluir una diversidad de diferentes componentes y diferentes funciones de una forma modular. Las diferentes realizaciones de la invención pueden incluir diferentes combinaciones de elementos y funciones y puede agrupar diversas funciones como partes de diversos elementos. Para fines de claridad, la invención está descrita en términos de sistemas que incluyen muchos componentes diferentes y combinaciones de componentes nuevos y componentes conocidos. No debería realizarse ninguna deducción que limite la invención a las combinaciones que requieran todos los nuevos componentes en cualquier realización ilustrativa de esta invención.

Como se utiliza en este documento "la invención" debería entenderse que incluye una o más realizaciones específicas de la invención (a menos que se indique explícitamente lo contrario). Se entenderán muchas variaciones de acuerdo con la invención a partir de las enseñanzas en este documento por los especialistas en la técnica.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una representación de valores de datos discretos capturados de una reacción a partir de 43 lecturas (por ejemplo, ciclos) tomadas de una reacción de amplificación de ácido nucleico que

puede usarse en un método de análisis de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

La FIG. 2 es una representación que ilustra los datos capturados de la reacción que muestran los conjuntos de datos del objetivo y de control que se han normalizado de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

5 La FIG. 3 es una representación que ilustra los datos de la reacción que muestran datos del objetivo y de control que se han puesto a escala de acuerdo con realizaciones de la invención.

La FIG. 4 es una representación que ilustra datos capturados de la reacción que muestran datos del objetivo y de control después del filtrado digital de acuerdo con realizaciones de esta invención.

10 La FIG. 5 es una representación que ilustra datos capturados de la reacción que muestran datos del objetivo y de control con los valores de la pendiente eliminados de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

La FIG. 6 es una representación que ilustra la transformada de proporciones de datos de la reacción del objetivo y de control de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

15 La FIG. 7 es una representación que ilustra la transformada de proporciones desplazada de los datos de la reacción del objetivo y de control de acuerdo con ejemplos que se usan para entender esta invención.

20 La FIG. 8 es una representación que ilustra los datos de reacción transformados interpolados mostrando los datos del objetivo y de control que se han interpolado de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para el entendimiento de esta invención.

La FIG. 9 es una representación que ilustra datos de la reacción interpuestos mostrando la identificación de los puntos FCN y MR de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención

25 La FIG. 10 es un diagrama de flujo para realizar una caracterización de los datos de la reacción de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

La FIG. 11 es una representación que ilustra métodos para la determinación de los datos de criterios de acuerdo con esta invención.

30 La FIG. 12 es una representación que ilustra dos conjuntos de datos de la reacción que ilustran cómo pueden variar las curvas de reacción para las mismas muestras de concentración inicial debido a diferentes anomalías de la reacción.

La FIG. 13 ilustra los cálculos de la eficacia de pico para los conjuntos de datos de la FIG. 12. La figura ilustra el deseo de utilización de una transformada de la eficacia desplazada de acuerdo con las realizaciones específicas de la presente invención.

35 La FIG. 14 ilustra datos para un recorrido de ensayo de HIV con ocho réplicas de muestras de concentración conocidas en 50, 500, 5.000, 50.000, 500.000 y 5.000.000 copias por ml.

La FIG. 15 es una representación que ilustra cuatro curvas lineales normalizadas generadas a partir de los datos de calibración de tres puntos usando cuatro valores relacionados con el número de ciclos diferentes (por ejemplo, FCN, FCN<sub>2</sub>, FCN<sub>MR Ajust.</sub>, y FCN<sub>Int. Ajust.</sub>), de acuerdo con realizaciones de esta invención.

40 La FIG. 16 compara las concentraciones calculadas con concentraciones conocidas para los datos ilustrados en la FIG. 14 usando las cuatro curvas ilustradas en la FIG. 15 de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

La FIG. 17 ilustra los resultados usando una calibración de un punto de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

45 La FIG. 18 ilustra los resultados de HBV experimentales usando un análisis de MR con una calibración de un punto de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para entender esta invención.

La FIG. 19 ilustra los resultados de HBV experimentales usando un análisis de MR y FCN<sub>MR Ajust.</sub>, con una calibración de un punto de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para entender esta invención.

50 La FIG. 20 ilustra los resultados de HBV experimentales usando un análisis de C<sub>t</sub> y una calibración de un punto de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para entender esta invención.

La FIG. 21 ilustra los resultados de HIV experimentales usando un análisis de MR y una calibración de un punto, por ejemplo usando las respuestas de  $10^3$  y  $10^7$  copias/ml como calibradores, de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para entender esta invención.

5 La FIG. 22 es una representación que ilustra dos tipos de datos de criterios de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para entender esta invención en la que la línea horizontal más baja representa datos de criterios adecuados para la diferenciación entre las reacciones negativas y las reacciones positivas.

10 La FIG. 23 es una representación que ilustra un FCN-MR para datos de HIV desde 50 copias/ml a 5.000.000 copias/ml analizados por un paquete de software de estadísticas para aplicar un ajuste de curva a los datos y para determinar intervalos de confianza de acuerdo con un ejemplo que puede usarse para el entendimiento de esta invención.

La FIG. 24 es una representación que ilustra datos internos de control analizados por un paquete software de estadísticas para determinar los intervalos de confianza de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para el entendimiento de esta invención.

15 La FIG. 25 es un diagrama de flujo que ilustra un árbol de análisis lógico para la evaluación de la validez de un ensayo mediante el análisis de pares de valor relacionado con el número de ciclo – valor relacionado con la eficacia tanto para las reacciones de amplificación de control interno como del objetivo de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

20 La FIG. 26 es un diagrama de flujo que ilustra un árbol de análisis lógico para el reporte de resultados del objetivo con la evaluación de los criterios de validez usando los pares de valor relacionado con el número de ciclo – valor relacionado con la eficacia de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

La FIG. 27 ilustra el cálculo de las mediciones del ancho de pico de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para el entendimiento de esta invención.

25 La FIG. 28 ilustra los resultados experimentales de HIV usando la medición del ancho de pico total de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

La FIG. 29 ilustra los resultados experimentales de HIV usando la medición del ancho de pico total para identificar una respuesta anormal de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

30 La FIG. 30 ilustra un ejemplo de una interfaz de usuario que representa una representación de FCN-MR de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

La FIG. 31 ilustra un ejemplo de una interfaz de usuario que representa una representación de la proporción desplazada de acuerdo con ejemplos que pueden usarse para entender esta invención.

35 La FIG. 32 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de un dispositivo lógico en el cual pueden realizarse diversos aspectos de la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 Como se usa en este documento, la expresión "valor relacionado con la eficacia" significa un valor que tiene una relación consistente con la eficacia de una reacción de amplificación. La expresión "transformada relacionada con la eficacia" significa una transformación matemática que involucra la respuesta en una reacción de amplificación que se usa para determinar un valor relacionado con la eficacia. La expresión "punto de reacción" significa un punto durante una reacción en el cual se produce un valor relacionado con la eficacia. El punto de la reacción puede ser un punto en el tiempo medido desde el comienzo de la reacción. Como alternativa, el punto de reacción puede ser un punto que denota un ciclo medido desde el comienzo de la reacción. El término "derivada" significa la pendiente de una curva en un punto dado de la curva.

50 La presente invención está dirigida al análisis de una muestra que contiene un analito. El analito puede ser un ácido nucleico. En el contexto de la presente invención, las copias de una porción del analito se producen (en adelante en este documento "se amplifican") de un modo que genera una señal detectable durante la amplificación. La señal es indicativa del progreso de la reacción de amplificación, y preferiblemente está relacionada o con la cantidad de analito y las copias del analito presente en la muestra de test, o está relacionada con la cantidad de copias de analito producidas por la reacción. La amplificación está preferiblemente configurada para permitir la acumulación logarítmica del analito objetivo (por ejemplo como en una reacción PCR), y en una realización más preferida, la amplificación es una reacción PCR en la cual los datos se recogen a intervalos regulares de tiempo y/o en un punto particular en cada ciclo de PCR.

Se han desarrollado muchos sistemas que son capaces de amplificar y detectar ácidos nucleicos. De forma similar, muchos sistemas emplean la amplificación de la señal para permitir la determinación de las cantidades de ácidos nucleicos que de otro modo estarían por debajo de los límites de detección. La presente invención puede utilizar cualquiera de estos sistemas, suponiendo que una señal indicativa de la presencia de ácido nucleico o de la amplificación de copias de ácido nucleico pueden medirse de una forma dependiente del tiempo o dependiente de ciclos. Algunos sistemas preferidos de detección de ácidos nucleicos que son útiles en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a estos, PCR, LCR, 3SR, NASBA, TMA y SDA.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es bien conocida en la técnica y se describe esencialmente en Science 230: 1350-2354 (1985) de Saiki y otros; Science 239: 487-491 (1988) de Saiki y otros; las Patentes de los Estados Unidos Números 5.538.848; 5.723.591; y 5.876.930 de Livak y otros y otras referencias. La PCR también puede usarse en conjunción con la transcriptasa inversa (RT) y ciertas polimerasas DNA multi-funcionales para transformar una molécula de RNA en una copia de DNA, permitiendo por lo tanto el uso de moléculas RNA como sustratos para la amplificación de PCR por la polimerasa de DNA. Myers y otros Biochem. 30:7661-7666 (1991).

Las reacciones de ligadura en cadena (LCR) son similares a la PCR con la mayor característica diferenciadora de que, en la LCR, se usa la ligadura en lugar de polimerización para las secuencias de amplificación del objetivo. La LCR se describe *entre otros* en la Patente Europea 320 308 de Backman y otros; Science 241: 1077 (1988) de Landegren y otros; Genomics 4:560 (1989) de Wu y otros. En algunas formas avanzadas de LCR, pueden aumentarse específicamente proporcionando un hueco entre los oligonucleótidos, cuyos huecos pueden rellenarse por la polimerización dependiente de plantillas. Esto puede ser especialmente ventajoso si no son necesarios todos los cuatro dNTP para rellenar los huecos entre las sondas de oligonucleótidos y no se suministran todos los cuatro dNTP en los reactivos de la amplificación. De forma similar, la amplificación del círculo rodante (RCA) se describe por Lisby, en Biotecnología Molecular 12(1): 75-99 (1999), Hatch y otros en Genet. Anal. 15(2): 35-40 (1999) y otros y es útil en el contexto de la presente invención.

Las reacciones de amplificación isoterma son también conocidas en la técnica y son útiles en el contexto de la presente invención. Ejemplos de reacciones de amplificación isotérmicas incluyen 3SR como se describe por Kwoh y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86: 1173-1177 (1989) y desarrollada adicionalmente en la técnica; NABSA se describe por Kievits y otros, J. Virol. Methods 35: 273-286 (1991) y desarrollado adicionalmente en la técnica; y el método de Amplificación de Desplazamiento de Filamento (SDA) como se describe inicialmente por Walker y otros en Proc. Nat. Acad. Sci (USA) 89: 392-396 (1992) y la Patente de los Estados Unidos N° 5.270.184 y desarrollada adicionalmente en la técnica.

De este modo, muchos sistemas de amplificación o detección que requieren sólo que las ganancias de señal indicativas de la cantidad de un ácido nucleico objetivo puedan medirse de una manera dependiente del tiempo o dependiente del ciclo son útiles en el contexto de la presente invención. Otros sistemas que tienen estas características son conocidos para los técnicos especialistas, y aunque no se han tratado anteriormente, son útiles en el contexto de la presente invención.

El análisis de los datos recogidos de la reacción de amplificación puede proporcionar respuestas a una o más de las siguientes cuestiones:

- (1) ¿Se encontró la secuencia objetivo?
- (2) si se encontró, ¿cuál fue el nivel o cantidad inicial de la secuencia objetivo?
- (3) ¿es correcto el resultado?
- (4) ¿funcionó correctamente la serie de reacción?
- (5) ¿hubo inhibición de la reacción deseada o esperada?
- (6) ¿es aceptable la recuperación de la preparación de la muestra?
- (7) si se usa ¿es aún válida la calibración para cualesquiera datos de referencia?

De acuerdo con algunas realizaciones de esta invención, una o más de estas cuestiones pueden contestarse identificando una región de interés (por ejemplo, un FCN) y un valor relacionado con la eficacia (por ejemplo, una MR) de una reacción de control interno y/o objetivo. En otras realizaciones, una o más de estas cuestiones pueden contestarse comparando tales valores con conjuntos de datos denominados en este documento como datos de criterios, curvas de criterios, y/o conjuntos de datos de criterios. En realizaciones adicionales, una o más de estas cuestiones pueden contestarse comparando los valores obtenidos para un control interno, por ejemplo una segunda reacción de amplificación de control, en la misma mezcla de reacción que sus datos de criterios. En otras realizaciones adicionales, una o más de estas cuestiones puede contestarse comparando los valores obtenidos para la reacción del objetivo con los valores obtenidos para una reacción de control interna en la misma mezcla de reacción

como sus datos de criterios respectivos.

Por claridad, la invención se ilustrará con referencia a las reacciones de PCR en tiempo real, que son una clase de técnicas de medición y supervisión de alto interés en sistemas automatizados y manuales para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos humanos, ácidos nucleicos animales, ácidos nucleicos de plantas, y ácidos nucleicos de humanos, de animales no humanos, y patógenos de plantas. La PCR en tiempo real está también bien adaptada para la detección de agentes de guerras biológicas y otros organismos vivos o víricos en el entorno. La PCR en tiempo real combina la amplificación de los objetivos de secuencia de ácido nucleico (NA) con la detección sustancialmente simultánea del producto de la amplificación. Opcionalmente, la detección puede estar basada en sondas fluorescentes o cebadores que están apagados o activados dependiendo de la presencia de un ácido nucleico. La intensidad de la fluorescencia es dependiente de la concentración o cantidad de la secuencia objetivo en una muestra (asumiendo, por supuesto, que la cantidad de objetivo está por encima de un límite mínimo detectable y es menor que cualquier límite de saturación). Esta capacidad de apagado/fluorescencia de la sonda permite que para condiciones del ensayo homogéneas, es decir, todos los reactivos tanto para la amplificación como la detección se añaden juntos en un contenedor de reacción, por ejemplo, un hueco único en una placa de reacción multi-hueco. Los sistemas de detección electrónicos, los sistemas basados en la captura de objetivo, y los sistemas y técnicas de análisis de parte alícuota son otras formas de sistemas de detección útiles en el contexto de la presente invención siempre que un sistema determinado acumule datos indicativos de la cantidad de objetivo presente en una muestra durante diversos puntos en el tiempo de una reacción de amplificación objetivo.

En las reacciones PCR, la cantidad de ácido nucleico objetivo se duplica en cada uno de los ciclos hasta que los reactivos se hacen limitantes o se agotan, o hay una competencia significativa, una fuente inadecuada de reactivos, u otros factores que se acumulan en el curso de una reacción. En los instantes durante los cuales una reacción PCR causa la duplicación (exacta) del objetivo en un ciclo particular, se dice que la reacción tiene una eficacia (e) de 1 (por ejemplo e = 1). Después de numerosos ciclos, pueden crearse cantidades detectables del objetivo a partir de una cantidad muy pequeña e inicialmente indetectable de objetivo. Típicamente, los protocolos de ciclos de PCR consisten alrededor de entre 30-50 ciclos de amplificación, pero las reacciones PCR que emplean más o menos ciclos son conocidas en la técnica y son útiles en el contexto de la presente invención.

En las reacciones PCR en tiempo real descritas más adelante para ilustrar la presente invención, la mezcla de reacción incluye un coctel reactivo apropiado de cebadores de oligonucleótidos, sondas de oligonucleótidos fluorescentes con tinte de marcado capaces de apagarse cuando no están ligados a un ácido nucleico complementario objetivo, encimas de amplificación, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), y reactivos de soporte adicionales. También, puede añadirse a la mezcla una segunda sonda de oligonucleótido fluorescente con tinte de marcado para la detección de una "secuencia de control" que se puede amplificar o "control interno" y un "tinte de referencia", que opcionalmente puede adjuntarse a un oligonucleótido que permanece sin amplificar a través de una serie de reacciones, para una reacción PCR en tiempo real. De este modo, algunos sistemas de PCR en tiempo real usan un mínimo de tres tintes fluorescentes en cada una de las muestras o contenedor de reacción (por ejemplo, un hueco). Sistemas PCR que usan una sonda o sondas adicionales fluorescentes para la detección de un segundo ácido nucleico objetivo son conocidos en la técnica y son útiles en el contexto de la presente invención.

Los sistemas que representan y visualizan los datos para cada una de las, una o más reacciones posibles (por ejemplo cada hueco en una placa multi-hueco) son también útiles en el contexto de la presente invención. Estos sistemas opcionalmente calculan valores que representan la intensidad de fluorescencia de la prueba como una función del tiempo o número de ciclo ( $C_N$ ) o ambos como una representación bidimensional (y respecto a x). De este modo la intensidad de fluorescencia representada puede representar opcionalmente un cálculo a partir de múltiples tintes (por ejemplo, el tinte de la sonda y/o el tinte de control normalizado por el tinte de referencia) y puede incluir la resta de una señal de fondo calculada. En los sistemas PCR, tal representación se denomina generalmente como una curva de amplificación de PCR y los datos representados pueden denominarse como datos de amplificación de PCR.

En la PCR, el análisis de datos puede hacerse difícil por varios factores. Por consiguiente, pueden realizarse diversas etapas para tener en cuenta estos factores. Por ejemplo, las señales de luz capturadas pueden analizarse para tener en cuenta la imprecisión en la propia detección de la luz. Tal imprecisión puede estar causada por errores o dificultades en la resolución de la fluorescencia de un tinte individual de entre una pluralidad de tintes en una mezcla de tintes (descrito más adelante como "solapamiento"). De forma similar, alguna parte de la señal puede estar presente (por ejemplo la "señal de fondo") y puede aumentar incluso cuando no hay ningún objetivo presente (por ejemplo, "deriva de línea base"). De este modo, para eliminar la señal de fondo varios técnicos preferiblemente incluyen la deriva de línea base, el análisis de tendencias y la normalización que se describen en este documento y/o son conocidos en la técnica. Estas técnicas son útiles pero no se requieren en el contexto de la presente invención. (La deriva de la línea base o la tendencia pueden estar causadas por muchas fuentes, tales como, por ejemplo, la inestabilidad de los tintes, la inestabilidad de la lámpara, las fluctuaciones de

temperatura, la alineación óptica, la estabilidad de los sensores, o combinaciones de los anteriores. Debido a estos factores y a otros factores de ruido, los métodos automatizados de identificación y corrección de la región de la línea base son propensos a errores).

5 Típicamente en la PCR, las respuestas de interés generalmente se determinan a partir de la curva de crecimiento, que arranca de forma característica casi plana durante los primeros ciclos de reacción cuando se ha producido una duplicación insuficiente para causar una señal detectable, y a continuación crece exponencialmente hasta que se dan una o más condiciones limitantes de la reacción, tales como cuando la extinción de uno o más reactivos, comienza a influir en la reacción de amplificación o el proceso de detección.

10 Se han propuesto varios métodos y se han usado en investigación y otros escenarios para analizar los datos de una reacción tipo PCR. Típicamente, estos métodos intentan detectar cuándo la curva de reacción ha alcanzado un punto particular, generalmente durante un periodo de crecimiento exponencial o casi exponencial de la señal (también conocido como la "fase logarítmico-lineal"). Aunque sin desear ligarlo a ninguna teoría, los inventores creen que los puntos más tempranos en los que puede observarse la fase logarítmico lineal por encima de la línea base o señal de fondo proporciona la información más útil acerca de la reacción y que la pendiente de la fase logarítmico lineal es un reflejo de la eficacia de la amplificación. Algunas referencias de la técnica anterior sugieren erróneamente que para que la pendiente sea un indicador de la amplificación real (en lugar de la deriva de la señal), tiene que haber un punto de inflexión, que es el punto sobre la curva de crecimiento donde termina la fase logarítmico-lineal. El punto de inflexión puede representar también la mayor tasa de cambio a lo largo de la curva de crecimiento. En algunas reacciones cuando se produce la inhibición, puede producirse el final de la fase de crecimiento exponencial antes de que la señal emerja desde el fondo.

25 Al correr un análisis de PCR, generalmente es deseable determinar uno o más resultados del ensayo con respecto a la cantidad/concentración inicial de las moléculas objetivo. Para los propósitos de la discusión, los resultados pueden expresarse por respuestas a al menos una de las cuatro cuestiones:

(1) ¿Estaba presente la molécula objetivo de forma absoluta en la muestra inicial, es decir un resultado de detección positivo/negativo)?

(2) ¿Cuál fue la cantidad absoluta del objetivo inicial presente?

30 (3) ¿Cuál es la confianza (por ejemplo, expresada a veces como un valor de confianza de que las respuestas a las cuestiones 1 ó 2 son correctas)?

(4) ¿Cuál es la cantidad relativa del objetivo presente en dos muestras diferentes?

Se han propuesto usar y pueden usarse varios métodos en la investigación y otros escenarios para contestar una o más de estas cuestiones.

35 Los datos para las reacciones PCR a menudo se recogen una vez en cada ciclo para cada tinte que se mide (es decir, la fluorescencia determinada) en una reacción. Aunque tales datos son útiles en el contexto de la presente invención, puede realizarse una cuantificación más precisa por la interpolación entre los puntos de datos adquiridos en cada ciclo. De este modo, los datos pueden analizarse para generar "números de ciclo fraccionales", y pueden determinarse puntos de interés para que coincidan con un número de ciclo particular o un punto de reacción entre cualquier par de números de ciclos.

40 Un problema con los métodos que se basan en umbrales, particularmente en el establecimiento de diagnósticos donde es deseable fijar umbrales, es que estos métodos pueden ser susceptibles de errores debido a la presencia de factores de ruido, particularmente factores de ruido sistemáticos, tales como, por ejemplo, el "acoplamiento" y el "solapamiento". El acoplamiento puede entenderse en general que ocurre cuando una señal de un ensayo en una localización (tal como un hueco en una placa multi-huecos) causa una anomalía en una localización diferente, usualmente adyacente a la localización del ensayo. El solapamiento puede entenderse en general que se produce en situaciones donde se detectan más de una señal o conjunto de datos a partir de la reacción. Aunque los tintes de detección para una reacción se seleccionan para que sean en gran medida independientes entre sí y tengan un espectro de emisión de fluorescencia individual, los espectros de emisión frecuentemente se solapan de modo que el espectro de emisión de un tinte se extenderá dentro del espectro de emisión de un tinte diferente.

55 Tanto el acoplamiento como el solapamiento pueden tener efecto para aumentar o disminuir la medición calculada de interés. Además, en ambos casos, puede haber situaciones donde la propia curva puede tener una anomalía debido a cualquiera o ambos fenómenos. Los factores de ruido sistemáticos tales como el acoplamiento o el solapamiento pueden ser especialmente difíciles de tratar cuando se realiza una corrección de la línea base.

En algunos sistemas de la técnica anterior, para detectar señales de bajo nivel para resultados cualitativos o resultados cuantitativos, generalmente se requiere un umbral bajo. Sin embargo, el uso de

un umbral bajo causa que la discriminación entre una falsa señal positiva debida al acoplamiento y una correcta señal positiva sea particularmente difícil, debido a que puede causar que la curva de PCR crezca por encima de un umbral de amplificación, sugiriendo por lo tanto que está presente un analito objetivo. El solapamiento positivo y negativo puede también presentar problemas. El solapamiento positivo puede producir un resultado falso positivo o puede causar estimaciones falsamente elevadas de la cantidad inicial de objetivo en una muestra, mientras que el solapamiento negativo puede causar estimaciones falsamente disminuidas de la cantidad inicial de objetivo en una muestra o indicar falsamente la ausencia de un objetivo en una muestra de test.

El método o sistema de esta invención puede identificar de forma reproducible una región en una curva o datos de reacción, preferiblemente usando un sistema de procesamiento de información, que puede usarse a continuación para proporcionar resultados basados en los datos de la reacción de amplificación. La invención puede identificar esta región independientemente del nivel base de la señal, incluso en presencia de ruido sustancial. La invención puede identificar además un valor que es representativo de la eficacia en esa región. Este valor puede usarse en la determinación de resultados primarios o en resultados de ajuste o en la determinación de valores de confianza como se describe en este documento o en todo lo anterior.

La invención puede ilustrarse por un examen específico, mostrado más adelante. En este ejemplo se usa un sistema de procesamiento de información para analizar datos que representan la curva de crecimiento de una reacción de amplificación. En la amplificación, se genera un "pico" por una etapa en el análisis de datos. La localización de este pico (medido en unidades de tiempo o en ciclos desde el inicio de la reacción de amplificación) se denomina como el número de ciclo fraccional (FCN) y el valor máximo del pico se denomina como el ERV (valor relacionado con la eficacia). Estos valores pueden usarse en un método para identificar una región del valor relacionado con la eficacia y para determinar un valor relacionado con la eficacia en este pico. Ambos valores pueden entenderse que están derivados de un método que analiza la forma de la curva de la reacción independientemente de la intensidad de la señal de amplificación, cuya intensidad de la señal de amplificación puede variar de reacción en reacción y de instrumento en instrumento, a pesar de comenzar con muestras idénticas. La curva de reacción es una representación de una reacción en la que una señal sustancialmente indicativa de la cantidad de objetivo en una reacción se representa como una función del tiempo o, cuando sea apropiado, en función del número de ciclo. El FCN puede entenderse como que está consistentemente relacionado con un punto de la eficacia de crecimiento máximo de una curva de reacción, y el ERV puede entenderse que está consistentemente relacionado con la eficacia en ese punto.

En algunas realizaciones de esta invención, los métodos analíticos pueden emplearse opcionalmente, y ventajosamente, sin usar la corrección de la línea base. En algunos sistemas y métodos de esta invención no se necesita un tinte de referencia.

La presente invención permite la cuantificación objetiva de la cantidad de un objetivo presente en una muestra de test sin necesidad de calcular un umbral subjetivo y variable o un valor de  $C_t$ , como se emplea en algunas técnicas de la técnica anterior. Además la invención puede usar información que está disponible para la determinación del grado de inhibición en una reacción analizando la forma de la curva de amplificación de PCR, incluyendo los datos que generalmente se han ignorado generalmente, tal como los datos en ciclos después de  $C_t$ .

Los métodos generales para la generación y uso de pares de datos determinados a partir de los datos de la curva de reacción se entenderán de los ejemplos de más adelante. Por claridad, estos ejemplos se refieren a un conjunto de datos específicos y funciones específicas para analizar esos datos, aunque la invención no está limitada a los ejemplos tratados.

#### Ejemplo 1 – Datos Capturados

A modo de ejemplo, un sistema típico de detección de una reacción PCR en tiempo real genera un fichero de datos que almacena la señal generada a partir de uno o más tintes de detección. La FIG. 1 ilustra una representación de datos capturados de la reacción que pueden usarse en un método analítico de acuerdo con la presente invención. En este ejemplo, una señal de tinte (DYE1) proporciona los datos del objetivo capturados, otra señal dye (DYE2) proporciona los datos capturados del control interno, y una señal dye adicional (DYE3) proporciona datos de referencia capturados opcionales. Estos datos representan datos de una reacción única, tomados de un fichero de salida normalizada. Esta representación particular puede entenderse que representa los datos iniciales para los cuales se ha aplicado algún tipo de algoritmo multi-componente. En esta representación, el eje x proporciona una indicación del número de ciclos (por ejemplo, 1 a 45) y el eje y indica la intensidad detectada del tinte, en unidades de fluorescencia relativa. En esta figura, los tres conjuntos diferentes de datos de captura se ilustran como curvas continuas. Sin embargo, los valores de datos capturados reales son generalmente valores de señal discreta capturados en cada número de ciclo. De este modo, un conjunto inicial de datos como se ilustra en la FIG. 1 puede consistir de tres conjuntos (objetivo, control y referencia) de los valores discretos adecuados (por ejemplo aproximadamente 50 valores en este caso).

## Ejemplo 2 – Normalización

Aunque opcionalmente, puede realizarse la normalización sobre los datos capturados en varios modos diferentes. Un método involucra dividir los valores de objetivo y control en cada uno de los ciclos leyendo la correspondiente señal del tinte de referencia. Como alternativa, el divisor puede ser el valor promedio de referencia sobre todos los ciclos o un promedio sobre ciertos ciclos. En otra realización alternativa, el divisor puede ser el promedio del tinte objetivo o del tinte de control o del tinte objetivo y del tinte de control sobre una o más de los ciclos más tempranos (línea base), cuando no se detecta ninguna señal de amplificación. Cualquier método de normalización conocido puede emplearse en el análisis de los datos. La invención puede usarse con datos que ya se han normalizados por un sistema PCR. La FIG. 2 es una representación de datos capturados de la reacción mostrando los conjuntos de datos de objetivo y de control que se han normalizado de acuerdo con la presente invención. En este ejemplo, como resultado de la normalización, la escala del eje y representa un puro número. En este caso, el número está entre aproximadamente 0 y 9. Son conocidos otros métodos de normalización en la técnica y pueden convertir este número para que esté entre aproximadamente 0 y 100 o para cualquier otro intervalo deseado.

Debido a que la normalización es opcional, la presente invención puede usarse para analizar datos de reacción sin el uso de la normalización o tinte de referencia. Como alternativa, la señal del objetivo o señal de control o ambas pueden usarse para normalización.

## Ejemplo 3 – Puesta a escala

La puesta a escala es opcional pero puede realizarse para hacer más fácil para un operador humano la visualización de los datos. La puesta a escala no afecta a los resultados analíticos. La Puesta a escala puede realizarse añadida a la normalización, en ausencia de normalización, o antes o después de la normalización.

Otro método de puesta a escala involucra dividir cada valor de conjunto de datos por el promedio de los valores durante algunos ciclos más tempranos, generalmente en la región de la línea de base antes de que se detecte cualquier señal de datos positiva. En este ejemplo, las lecturas de 4 hasta 8 se promediaron y se realizó primero la normalización. La FIG 3 es una representación de datos de reacción que muestran datos del objetivo y de control que se han puesto a escala. En este ejemplo, la puesta a escala fuerza los valores tempranos del objetivo y de control a uno, y ya que los valores tempranos son menores que uno, la división fuerza los valores posteriores a números puros ligeramente mayores.

## Ejemplo 4 – Filtrado Digital

Pueden aplicarse uno o más métodos de filtrado digital a los datos capturados para "limpiar" los conjuntos de datos de señal y mejorar la proporción de señal a ruido. Son conocidos muchos algoritmos de filtrado diferentes. La presente invención puede emplear un filtro de cuatro polos sin ningún cero. Esto elimina el potencial rebasamiento de la señal filtrada. Como ejemplo, esto puede implementarse con la función MATLAB "filtfilt" proporcionada por el Conjunto de Herramientas de Procesamiento de Señal MATLAB, que filtra tanto hacia adelante como hacia atrás para eliminar cualquier hueco de fase (retardos de tiempo). Un ejemplo de parámetros y una llamada de la función MATLAB son como sigue:

```
b=0,316;
a=[1.0000 -1.0000 0,3750 - 0,625 0,0039];
datos (:, :, ensayo)=filtfilt(b, a, datos(:, :, ensayo));
datos (:, :, ic)=filtfilt(b, a, datos(:, :, ic));
```

En este ejemplo, "b" y "a" contiene los coeficientes del filtro "datos(:, :, ensayo)" y "datos(:, :, ic)" contiene los datos capturados que pueden haberse o no normalizado, puesto a escala, o ambas cosas. En este caso, los datos filtrados están ambos normalizados y puestos a escala. La FIG. 4 es una representación de datos de reacción capturados que muestran los datos del objetivo y de control después del filtrado digital. Los valores no se cambian por el filtrado digital, pero el conjunto de datos se "suavizan" algo.

## Ejemplo 5 – Eliminación de Pendiente/Alineamiento Base

Puede usarse un método de eliminación de pendiente opcional para eliminar cualquier pendiente residual que esté presente en la señal de la línea base temprana antes de que se produzca cualquier señal real detectable. Este procedimiento puede denominarse también como alineamiento base, pero en algunas realizaciones, el desplazamiento no se elimina, sólo la pendiente. De acuerdo con esta invención, para la eliminación de pendiente, se examinan tanto la señal del objetivo (DYE1) como la señal de control (DYE2) simultáneamente. Cualquier señal que aparezca primero contamina el punto de regresión directa, y el método generalmente vuelve atrás 10 ciclos. Si 10 ciclos hacia atrás es antes el ciclo 5, entonces se

5 usa el ciclo 5 como el punto de regresión inicial para evitar los transitorios de la señal más temprana. Se calcula una línea de regresión lineal usando los datos de señal entre estos puntos y la pendiente de la regresión para cada tinte se resta de la de esa señal de tinte. En este caso, se aplica la eliminación de la pendiente a los datos normalizados, puestos a escala, y filtrados como se ha tratado anteriormente. La FIG. 5 es una representación de datos de reacción capturados mostrando datos del objetivo y de control con los valores de pendiente eliminados. En cada una de estas figuras, estaba presente una pendiente muy pequeña en los ciclos tempranos; por lo tanto, la eliminación de la pendiente no afecta sustancialmente a los valores de los datos capturados.

Ejemplo 6 – Calculo de la Transformada

10 Un ejemplo que no es parte de esta invención, pero que es útil para su entendimiento es el método MaxProporcion. En este método, se calcula la proporción entre mediciones secuenciales, obteniendo por lo tanto una serie de proporciones, cada una de las cuales puede indexarse a un valor del tiempo o un número de ciclo. Existen muchos medios adecuados de calcular estas proporciones, y puede usarse cualquier medio adecuado. El modo más simple de realizar este cálculo de proporciones utiliza la siguiente función:

$$Proporción(n) = \frac{s(n+1)}{s(n)}$$

20 donde n representa el número de ciclo y s(n) representa la señal en el ciclo n. Este cálculo proporciona una curva que comienza aproximadamente en 1 en la región de la línea base de la respuesta, aumenta a un máximo durante la región de crecimiento, y vuelve aproximadamente a 1 en la región plana. La expresión MATLAB que realiza este cálculo de forma eficaz es el siguiente:

$$Proporción = s(2:fin,:)./s(1:fin-1:),$$

25 donde "s" representa la matriz de respuestas de señal representando cada columna una respuesta separada.

30 La FIG. 6 muestra un ejemplo de esta transformada de proporciones. Debido a la fluorescencia de fondo intrínseca, la proporción no alcanza 2 como sería de esperar de una reacción PCR si la señal se duplicase. A pesar de todo, la magnitud del pico es independiente de las variaciones de intensidad multiplicativas y es proporcional a la tasa de crecimiento o la eficacia en ese punto. El método de cálculo de proporciones es simple y se calcula de forma eficaz. Podrían realizarse otros cálculos equivalentes. Un ejemplo involucraría el cálculo de las proporciones directa e inversa y promediándolos a continuación. Puede utilizarse la inversa de la proporción, en cuyo caso la curva empezará en un valor de aproximadamente 1 en la región de la línea base, disminuirá en la región de crecimiento, y volverá al valor de aproximadamente 1 en la región plana. A continuación se usaría la magnitud y la localización de la depresión en lugar de un pico para el análisis. Esta transformada puede implementarse de un modo esencialmente equivalente al método de la proporción.

40 Aunque el algoritmo de MaxProporción es utilizable como se ha descrito, es conveniente desplazar la curva restando una constante, por ejemplo, aproximadamente uno (1), de cada punto. Esta proporción proporciona una transformación de la respuesta original, que comienza cerca de cero en la región de la línea base, crece hasta un pico en la región de crecimiento de la curva, y vuelve a cerca de cero en la región plana. Este cálculo de proporción desplazada se describe por la siguiente función:

$$Proporción(n) = \frac{s(n+1)}{s(n)} - 1$$

45 La FIG. 7 muestra la salida de este cálculo de la proporción desplazada. El punto de reacción y la magnitud del pico de la curva de proporciones desplazada se determinan a continuación. El punto de reacción (es decir, la distancia a lo largo del eje x) especifica el valor FCN de la MR y la magnitud especifica el valor de MR relacionado con la eficacia (Máximo de la Proporción).

Ejemplo 7 – Interpolación

50 Para mejorar la resolución del número de ciclo, puede realizarse una interpolación. Se conocen en la técnica muchos modos de realizar esta operación. Un método de interpolar en el contexto de la invención es una interpolación de spline cúbica, que proporciona una interpolación suave, de modo que incluso la segunda derivada de los conjuntos de datos capturados será continua. La invención puede usarse para interpolar la serie entera de datos. La invención puede usarse para determinar una región de

interés y a continuación interpolar sólo en esa región para conseguir una resolución sub-periódica, o sub-ciclo. Un ejemplo de un comando MATLAB para la realización de una interpolación de spline cúbica es como sigue:

```
salida = interpolación 1 (x, entrada, x2, 'spline')
```

5 donde "x" representa número del periodo (o ciclo) (1, 2, 3...), "entrada" representa la señal no interpolada en esos ciclos, "x2" representa el vector del periodo de más alta resolución (o ciclo) (1.00, 1.01, 1.02,...) y "salida" representa la señal interpolada que corresponde a los ciclos fraccionales en "x2".

10 La FIG. 8 es una representación de los datos de reacción capturados que muestran los datos del objetivo y de control que se han interpolado para proporcionar continuidad de la función. Como resultado de la interpolación, el número de valores en el conjunto de datos generalmente aumentará sustancialmente, por ejemplo de 43 valores a 4201 valores.

15 Debería entenderse que las etapas descritas anteriormente pueden realizarse en diferentes órdenes, tal como, por ejemplo, un primer filtrado, seguido por el alineamiento base antes de la puesta en escala. Sin embargo, si la interpolación se realiza antes del cálculo de la proporción, deberá tenerse cuidado para seleccionar los valores de respuesta interpolada apropiados para el cálculo de la proporción. Es importante que el intervalo entre valores de proporción permanezca igual. De este modo, si se usan ciclos como el periodo de medición, y la interpolación aumenta la resolución del tiempo a 0,01 ciclos, entonces la proporción desplazada en  $x=2,35$  sería  $\text{Proporción} = s(3,35)/s(2,35) - 1$ .

Ejemplo 8 – Encuentro de Picos para Determinar FCN y ERV (por ejemplo, MR) de Objetivo y Control

20 Otra etapa es seleccionar los picos en la serie de datos. Esta operación involucra las etapas (1) encontrar picos locales y (2) seleccionar de los picos locales uno o más para análisis adicional, usando opcionalmente datos de criterios (definidos *infra*).

25 Un algoritmo de encuentro de picos identifica cuando la pendiente de la curva cambia de positiva a negativa, lo que representa un máximo local. El algoritmo identifica la localización y la magnitud de los picos. Un ejemplo de una función MATLAB para hacer este cálculo es como sigue:

```
function (ind, peaks) = findpeaks (y)
% FINPEAKS encuentra picos en vectores reales.
% ind = findpeaks (y) encuentra el índice (ind) que es
% un máximo local en la secuencia y.
30 % (ind, peaks) = findpeaks (y) devuelve el valor de
% los picos en estas localizaciones, es decir peaks = y(ind);
y = y (:)' ;
switch length (y)
case 0
35     ind = 0 ;
case 1
     ind = 1;
otherwise
     dy = diff (y)
40     not_plateau_ind = find <dy~=0>;
     ind = find (([dy (not_plateau_ind) 0] < 0) &
        ([0 dy (not_plateau_ind)] >0));
     ind = not_platay_ind (ind);
end
45 if nargin >1
```

peaks = y (Ind);

end

La FIG. 9 es un cálculo de la eficacia que muestra los valores de FCN y MR identificados de los tintes del objetivo y de control interno y una curva de criterios de acuerdo con los ejemplos que pueden usarse para entender la presente invención. Para los datos del objetivo, FINDPEAKS localizó un pico en el eje  $x = 19,42$  con una amplitud de  $0,364$ . Para los datos de control interno, FINDPEAKS encontró picos en  $2,03$ ;  $5,29$ ;  $7,67$ ;  $12,83$ ;  $22,70$ ;  $37,86$ , con magnitudes respectivas de  $0,0027$ ;  $0,0027$ ;  $0,0022$ ;  $0,0058$ ;  $0,1738$ ; y  $0,0222$ .

Ejemplo 9 – Selección de Picos para Determinar FCN y ERV (por ejemplo, MR) de Objetivo y Control

En el método tratado anteriormente, se identifican a menudo varios picos de máximos locales tanto para los datos de objetivo como los datos de control. Pueden usarse diversos métodos para seleccionar cuales de estos picos de máximos locales se usarán para la determinación de FCN y ERV.

Típicamente, y en particular durante las reacciones con buen comportamiento, se selecciona el pico más alto o pico máximo. En muchas situaciones, esta selección proporciona el punto de la reacción más reproducible a partir del cual realizar cálculos adicionales como se trata en este documento. Sin embargo, en algunas situaciones, es preferible un primer pico, o un primer pico por encima de un corte particular o después de un número de ciclos particular. De este modo, en ejemplos particulares, puede emplearse la selección de Pico Máximo o Primer Pico donde Max Pico encuentra el mayor pico en la curva de proporciones desplazada mientras que Primer Pico encuentra el primer pico que es más alto que un algún valor seleccionado.

Una vez que se han determinado los datos de criterios, estos datos pueden usarse también para determinar el pico a seleccionar para la determinación de ERV durante la operación real, particularmente para señales débiles o ruidosas.

En la FIG. 9, por ejemplo, para los datos DY2, el algoritmo de encontrar-picos encontró seis picos locales, pero el pico quinto fue el pico máximo y fue también el único que estaba por encima de la curva de criterios. De este modo, en este ejemplo, el FCN determinado para DY2 es  $22,70$  y la MR determinada para DY2 es  $0,1738$ .

También puede usarse un dispositivo de información o aparato de sistema para realizar los métodos de esta invención. La FIG. 10 es un diagrama de flujo para realizar una caracterización de los datos de una reacción de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Detalles adicionales de este método general se entenderán a partir de la discusión de más adelante.

Los métodos analíticos descritos en este documento pueden aplicarse a reacciones que contienen concentraciones de objetivo conocidas o desconocidas. En una realización, se incluirán concentraciones conocidas de ácido nucleico objetivo en huecos de calibración en una reacción realizada en una placa de reacción multi-hueco, y el ERV y el valor del punto de la reacción se usarán a partir de estas muestras de concentración conocidas para realizar la cuantificación. Pueden usarse concentraciones conocidas también para desarrollar los datos de criterios como se describe adicionalmente en este documento.

Ejemplo 10 – Determinación de Curva de Criterios/Conjuntos de Datos de Criterios

En otras realizaciones, los valores relacionados con la eficacia (por ejemplo los valores de MR) pueden representarse como una función de los valores de sus valores de puntos de la reacción (valores FCN) para varios conjuntos de datos de concentración conocida para generar una curva de criterios característica para un ensayo particular. La curva de criterios es característica de una formulación de un ensayo y protocolo de detección particulares y puede usarse para determinar de forma fiable los resultados positivos/negativos, para determinar si un resultado particular debería descartarse como no fiable, para determinar una medida de confianza de un resultado, o cualquier combinación de los anteriores. En general, un par de datos de reacción que descansan bajo una curva de criterios indican muestras no reactivas, o reacciones no funcionales, tales como las reacciones que encuentran una inhibición significativa.

Los datos de criterios pueden usarse para seleccionar qué picos reportar o usar en un análisis de reacción, o ambos. Los datos de criterios proporcionan un método automático y fiable para la discriminación entre resultados negativos (por ejemplo, objetivo no presente en absoluto) y resultados que muestran baja cantidad de objetivo.

La FIG. 11 es una representación en la cual se representan la MR de seis conjuntos de reacciones de concentración conocida (es decir, normalizadores o calibradores) y un conjunto de reacciones negativas, como una función del valor de FCN calculado del valor de MR. Esta representación permite seleccionar una curva de criterios. Una curva de criterios, que se describió anteriormente, es

cualquier curva o línea que separa los resultados positivos de los resultados negativos. La curva de criterios se selecciona preferiblemente de modo que está relativamente próxima y por encima de los datos de reacción negativa (en el espacio x-y de la representación). En la FIG. 11, los pares de datos MR-FCN procedentes de varias muestras de concentraciones conocidas determinadas bajo la misma o similares condiciones de ensayo se representan junto con pares de datos MR-FCN de muestras que no contienen el objetivo del ensayo, cuyas muestras se han denominado también como negativas. Aunque las negativas no deberían exhibir ninguna respuesta de amplificación, el método analítico si determina un par de datos MR-FCN para estas muestras. Estos datos para las muestras negativas usualmente corresponden a máximos del ruido dirigido sobre la salida de respuesta, que es generalmente una respuesta aleatoria. El valor de MR determinado a partir del ruido es muy bajo y lejos de las respuestas de muestras de concentraciones conocidas. Los pares de MR-FCN para las reacciones negativas pueden agruparse si hay una fuente de ruido sistemático, tal como el solapamiento, en cuyo caso los pares MR-FCN pueden aparecer falsamente como señales de reacción positivas. En la caracterización de la respuesta MR-FCN, de verdaderos positivos frente a verdaderos negativos, puede identificarse una clara región de separación entre estos dos conjuntos de datos, que se representan por la línea o curva discontinua en la FIG. 11, la curva de criterios. En esta figura, cada círculo representa un par de datos FCN-MR. En este caso, cada una de las agrupaciones de círculos representa múltiples respuestas en concentraciones conocidas del objetivo. Hay ocho réplicas diferentes en seis concentraciones conocidas dentro de este ejemplo. Desde la derecha de la representación, por ejemplo, estas concentraciones conocidas pueden representar concentraciones de 50 copias/ml,  $5 \times 10^2$  copias/ml,  $5 \times 10^3$  copias/ml,  $4 \times 10^4$  copias/ml,  $5 \times 10^5$  copias/ml, y  $5 \times 10^6$  copias/ml. Estas agrupaciones de datos de criterios pueden usarse para generar una curva de criterios.

Pueden usarse múltiples conjuntos de datos de criterios relativamente simples para proporcionar curvas características de criterios para varios ensayos. Un enfoque útil involucra tomar la media de los valores de MR para el conjunto de respuestas negativas y añadir a este valor un múltiplo de la desviación estándar de los valores de MR para las respuestas negativas. Para el ejemplo mostrado en la FIG. 11, la curva de criterios se fijo como una línea horizontal igual a la media más 10 desviaciones estándar de los valores de MR para las respuestas negativas. El valor de criterio en este ejemplo se calculó que era aproximadamente 0,026. En algunos sistemas, otras consideraciones pueden producir una modificación del valor de criterio (por ejemplo, un valor de FCN-MR) deseable para tener en cuenta potenciales anomalías de señal, tal como, por ejemplo, el acoplamiento o solapamiento positivo. El acoplamiento puede resultar de una señal en un hueco positivo de un instrumento multi-hueco que influye en la señal de un hueco diferente. Como mucho se ha observado un acoplamiento de un 2% en ciertos instrumentos. Por esta razón, pueden aumentarse los criterios de modo que eviten la clasificación de muestras negativas verdaderas como muestras positivas. Para los datos de ensayo representados en la FIG.11, los valores más altos de MR para los ensayos positivos son aproximadamente 0,5. El dos por ciento de este valor es 0,010. Aumentando el criterio en 0,010 deberían eliminarse los falsos positivos debidos al acoplamiento. Ya que los valores más altos de MR en este ensayo sólo ocurren con muestras de mayor concentración que tienen valores de FCN más pequeños, los criterios puede aumentarse sólo en los valores de FCN más pequeños, donde es probable que se produzca el acoplamiento. Este conjunto de criterios modificados puede describirse por una serie de pares de datos  $(X_n, Y_n)$  que describen una curva multi-elemento. Por ejemplo, la curva de criterios modificada en la FIG. 11 puede especificarse por el conjunto de datos de criterios:

$$(X_1; Y_1) = (1; 0,036)$$

$$(X_2; Y_2) = (20; 0,036)$$

$$(X_3; Y_3) = (25; 0,026)$$

$$(X_4; Y_4) = (45; 0,026)$$

Como ejemplo adicional, la curva de criterios mostrada en la FIG. 10 puede especificarse por el conjunto de datos de criterios

$$(X_1; Y_1) = (1; 0,10)$$

$$(X_2; Y_2) = (10; 0,10)$$

$$(X_3; Y_3) = (20; 0,05)$$

$$(X_4; Y_4) = (40; 0,05)$$

Las curvas de criterios y/o los conjuntos de datos de criterios, incluyendo los conjuntos que tienen formas diferentes o formas más complejas o ambas, pueden determinarse sin experimentación excesiva. El uso pretendido de la aplicación de PCR llamará a enfoques diferentes para el establecimiento de líneas de criterios. Los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que cuando se desea alta sensibilidad en un ensayo, se usa una línea de criterios baja. Por ejemplo, si un ensayo está diseñado

para la diferenciación de variantes de secuencias, tales como una secuencia de consenso de población (es decir, una secuencia "tipo salvaje") frente a secuencias polimorfas o variantes, (por ejemplo "un polimorfismo nucleótido único"), entonces puede usarse una línea de criterios de un valor más alto, porque usualmente no se requiere la detección de cantidades limitantes de un ácido nucleico objetivo en la determinación de variantes de secuencias.

El ejemplo particular mostrado en la FIG. 11 no exhibe solapamiento positivo desde la respuesta de la señal de control interna (IC) a la respuesta de la señal de ensayo. Si estuviese presente la respuesta de la señal IC positiva para el solapamiento del ensayo, podría efectuarse una modificación similar para el criterio. Como la respuesta de la señal IC debería producirse sólo sobre un estrecho intervalo de valores de FCN, el criterio podría aumentarse sólo en ese intervalo limitado.

Generalmente, como se trata adicionalmente en este documento, una respuesta FCN-MR se determina para muestras de concentración conocidas a través del intervalo de concentración del objetivo de interés para definir la respuesta normal. Estudios adicionales en una población de muestras que desafían la reacción de ensayo pueden realizarse para ver cuánto deterioro en MR es aceptable antes de que se comprometa el funcionamiento del ensayo. Estos tipos de análisis de caracterización pueden usarse para establecer datos de criterios o conjuntos de datos de criterios independientemente de la desviación estándar u otras características del ruido o línea base observada cuando las muestras que no contienen ácido nucleico se tratan bajo condiciones de amplificación.

De acuerdo con otras realizaciones de la invención, los datos de criterios pueden determinarse de formas similares para la determinación de  $C_t$ , para el análisis de  $C_t$  como se ha hecho en la técnica anterior. Un ensayo particular bajo diseño puede efectuarse varias veces para caracterizar su respuesta típica de MR-FCN. A partir de esta respuesta típica, puede definirse el conjunto de datos de criterios. Sin embargo, a diferencia del análisis de  $C_t$ , en FCN-MR, la respuesta es independiente de la intensidad de señal y es fácilmente reproducible, incluso a través de instrumentos de un tipo particular que produce resultados altamente variables con idénticas muestras.

#### Ejemplo 11 – Región Alternativa de Interés

Se ha visto empíricamente que el valor de FCN de un valor relacionado con la eficacia como se determinó anteriormente puede ajustarse ventajosamente para proporcionar un valor de cuantificación incluso más reproducible. Por ejemplo, la FIG. 12 es una representación de dos conjuntos de datos de reacción que ilustran cómo pueden variar las curvas de reacción para muestras que tienen la misma concentración inicial debido a diferentes anomalías de la reacción. Esta figura ilustra dos respuestas para muestras que contienen cantidades iguales de un ácido nucleico objetivo HIV. Sin embargo, en una respuesta, la señal obtenida de la reacción cae temprano debido a una anomalía en la reacción. Esta caída puede causar que el valor de FCN determinado a partir del máximo de la curva de proporciones desplazada varíe sustancialmente entre las dos muestras, como se ilustra en la FIG. 13. Sin embargo, la figura también muestra que las dos curvas de gradiente son sustancialmente más similares en los primeros momentos o números de ciclos, que se representan sobre el eje x del gráfico.

De este modo, la invención involucra la determinación de una desviación desde el número de ciclo del valor de eficacia máxima (en este documento denominado como el valor FCN2), que es la localización de otro punto sobre la curva de reacción que puede usarse para análisis como se describe en este documento. En realizaciones adicionales, puede seleccionarse un valor del Umbral del Valor Relacionado con la Eficacia (ERVT) o del Umbral de Proporción (RT) y usarse para determinar una región de números de ciclo de interés. Un valor de ERVT o de RT pueden ser valores determinados automáticamente o empíricamente para un ensayo particular. El valor de RT puede fijarse en un nivel de datos de criterio o próximo que se determina en los ciclos posteriores durante la calibración del ensayo.

Una realización de un método de esta invención comienza en el valor de FCN sobre la curva de proporciones desplazada y determina un punto de reacción temprano donde la curva cruza el valor de RT. Este punto de reacción se reporta como un valor de FCN2. Se cree que el valor FCN2 proporciona una linealidad mejorada en las muestras que tienen bajo número de copias, en contraste con los valores de FCN para ciertos ensayos, tales como las reacciones donde la formación de productos no específicos reduce la eficacia de la formación de producto en las muestras que tienen bajos números de copias.

La FIG. 13 ilustra lo deseable de usar un valor de eficacia desplazado. Esta figura muestra las curvas de proporción desplazadas para las respuestas mostradas en la FIG. 12 y una línea RT en 0,03. Para este ejemplo, los valores de FCN y FCNW se muestran en la Tabla 1

TABLA 1

Respuesta	FCN	FCN2	MR
Hueco 41	28,81	22,85	0,129
Hueco 42	28,06	22,92	0,097
<i>Diferencia</i>	0,75	0,07	0,032

En este ejemplo, la curva de una respuesta se aplanar pronto y difiere en la forma de la curva de la otra respuesta, y la curva de proporciones desplazada muestra una diferencia. El aplanamiento temprano puede causar un pico temprano. En este ejemplo, los valores de FCN2 tienen una coincidencia más estrecha que los valores de FCN. En general se ha encontrado que los valores de FCN y FCN2 son más precisos (menores desviaciones estándar) que los valores de Ct. Aunque estos ejemplos se enfocan en el uso de MR en las realizaciones de FCN y FCN2 de la presente invención, las transformadas relacionadas con la eficacia están limitadas al uso de la primera derivada.

Ejemplo 12 – Cuantificación usando el Análisis de MR-FCN

La cuantificación se desea a menudo en diversos tipos de análisis de reacción. En reacciones de PCR, por ejemplo, la cuantificación se refiere generalmente a un análisis de una reacción para estimar una cantidad o concentración de comienzo de un objetivo que tiene una concentración desconocida. La invención involucra métodos o sistemas o ambos para el uso de un valor relacionado con la eficacia y un valor del número de ciclo (por ejemplo, el FCN) para realizar una cuantificación. Específicamente, el ERV de una muestra de test se compara con uno o más de los ERV de al menos un calibrador, preferiblemente al menos dos calibradores, y opcionalmente 3, 4, 5 ó 6 calibradores, cada uno de los cuales contiene una cantidad conocida de un ácido nucleico objetivo.

En realizaciones adicionales, la cuantificación puede entenderse generalmente que involucra una o más capturas de datos de calibración y una o más capturas de datos de cuantificación. Los datos de calibración y cuantificación se relacionan usando una asociación de cuantificación o una ecuación.

En la calibración, una asociación entre los datos capturados, o un valor derivado de los datos capturados (tal como un FCN, FCN2, o MR, o combinación de los anteriores), y una o más reacciones de concentración de comienzo conocida se usan para establecer uno o más parámetros para una ecuación de cuantificación. Estos parámetros pueden usarse a continuación para determinar las concentraciones de comienzo de una o más reacciones desconocidas.

Se conocen diversos métodos y técnicas para la realización de la cuantificación y/o calibración en el análisis de una reacción. Por ejemplo, en el establecimiento de diagnósticos de PCR, no es infrecuente analizar muestras de test en una placa de reacción de 96 huecos. En cada uno de los 96 huecos de la placa de reacción, algunos huecos se dedican a reacciones de calibración con muestras que tienen una concentración de objetivo inicial conocida. Los valores de calibración determinados para estas muestras pueden usarse a continuación para cuantificar las muestras de concentración desconocida en el hueco.

Dos tipos generales de métodos de calibración se denominan como la calibración de un punto y calibración de curva normalizada (por ejemplo, múltiples puntos). Ejemplos de estos tipos se muestran a continuación. Sin embargo puede usarse cualquier método de calibración adecuado en el contexto de la presente invención.

Cuando no hay ninguna inhibición o interferencia, la reacción de PCR procede con la secuencia objetivo mostrando un crecimiento exponencial, de modo que después de N ciclos de replicación, la concentración inicial del objetivo se ha amplificado de acuerdo con la siguiente relación:

$$Conc_N \propto Conc_0(1 + e)^N$$

que también puede expresarse como:

$$Conc_0 \propto Conc_N \times \frac{1}{(1 + e)^N}$$

donde  $Conc_N$  representa la concentración del objetivo amplificado después de N ciclos de

reacción,  $Conc_0$  representa la concentración objetivo inicial antes de la amplificación,  $N$  representa el número de ciclo y  $e$  representa la eficacia de la amplificación objetivo.

5 Se usa el análisis cuantitativo de datos para analizar en tiempo real las curvas de reacción PCR de modo que se determina  $Conc_0$  con un grado de precisión aceptable. Los métodos de análisis de  $C_t$  anteriores intentan determinar un número de ciclo en un punto de la reacción donde la  $Conc_N$  es la misma para todas las reacciones bajo análisis. El valor de FCN determinado por los métodos de la invención proporciona una buena estimación para el número de ciclo  $N$  para un ensayo en el cual no se ha demostrado ninguna inhibición significativa o degradación de señal sobre el rango dinámico de la concentración de objetivo de entrada. Puede usarse la siguiente relación de proporcionalidad entre una  
10 concentración de partida y el FCN:

$$Conc_0(FCN) \propto \frac{1}{(1+e)^{FCN}}$$

15 donde  $Conc_0(FCN)$  representa la estimación de la concentración objetivo inicial determinada usando el valor de FCN como se determina por los métodos de esta invención.

En otras palabras, cuanto menor es la concentración de objetivo de comienzo, mayor es el valor de FCN determinado por la reacción PCR. Esta relación puede usarse tanto para datos de calibración como para datos de cuantificación.

Esta relación de proporcionalidad puede expresarse como una equivalencia, tal como

$$Conc_0(FCN) = K \times \frac{1}{(1+e)^{FCN}}$$

20 donde  $K$  representa una constante de proporcionalidad de calibración.

Para los datos de calibración,  $Conc_0(FCN)$  representa una concentración conocida, tal como 500.000 copias de ácido nucleico objetivo/ml; el exponente FCN es el número de ciclo FCN determinado como se ha descrito anteriormente; y  $e$  representa el valor de la eficacia para una reacción, con  $e=1$  indicando una duplicación en cada ciclo. Estos factores se combinan para formar una relación para  
25 permitir la determinación de la constante de proporcionalidad. La determinación de la constante de proporcionalidad puede realizarse sólo si hay un conocimiento *a priori* de la eficacia,  $e$ , de la reacción de amplificación. Este conocimiento *a priori* posibilita la calibración de un punto. Para datos de cuantificación, los valores de FCN se determinan para reacciones que involucran muestras que tienen concentraciones desconocidas de objetivo. Los valores de FCN se convierten a continuación en valores de concentración por el uso de la ecuación anterior. Si la eficacia,  $e$ , no es conocida *a priori*, entonces puede usarse el  
30 método de cuantificación de curva normalizada. En este caso, para los datos de calibración, se amplifican diferentes muestras que tienen diferentes niveles de concentración conocidos, y se determinan los valores de FCN de las muestras. Estos valores de FCN pueden representarse frente a logaritmo (en base 10) de las concentraciones conocidas para describir un logaritmo (concentración) frente a una respuesta de FCN.  
35 Para un ensayo que no demuestra ninguna inhibición o degradación de la señal significativas sobre el intervalo dinámico de las concentraciones de objetivo de entrada, esta respuesta está típicamente bien ajustada por una curva lineal. La siguiente ecuación describe la forma de esta curva normalizada:

$$\text{Log}_{10}(\text{Conc}_0(\text{FCN})) = m \times \text{FCN} + b$$

40 donde  $\text{Log}_{10}(\text{Conc}_0(\text{FCN}))$  representa el logaritmo (en base 10) de la concentración inicial,  $m$  representa la pendiente de la curva normalizada lineal, y  $b$  representa la intercepción de la curva normalizada lineal.

Usando dos o más muestras de calibración de concentración conocida, puede aplicarse una  
45 regresión lineal para determinar la pendiente  $m$ , y la intercepción  $b$ , de la curva normalizada. Para los datos de cuantificación, se determinan los valores de FCN para las reacciones que involucran muestras de test de concentración desconocida, cuyos valores se convierten a continuación a valores logarítmicos (concentración) para uso de la ecuación lineal anterior. Los resultados pueden reportarse bien en logaritmo (concentración) o en unidades de concentración por la conversión apropiada.

Debería observarse que la ecuación de calibración de un punto se convierte fácilmente a esta forma de curva normalizada lineal:

50

$$Conc_0(FCN) = K \times \frac{1}{(1+e)^{FCN}}$$

$\text{Log}_{10}(\text{Conc}_0(\text{FCN})) = -\text{log}_{10}(1+e) \times \text{FCN} + \text{log}_{10}(K)$ . El coeficiente lineal  $m$  puede usarse para calcular la eficacia de la reacción PCR particular.

Ejemplo 13 – Ajustes de Cuantificación

5 Cuando las reacciones PCR están sujetas a inhibición, la intensidad de la señal de PCR en tiempo real resultante puede deprimirse o retrasarse. El efecto de esta degradación de la señal sobre el valor relacionado con la eficacia tal como MR es una reducción en ese valor. Además, el efecto de la degradación de la señal sobre el número de ciclo fraccional es generalmente para identificar el FCN en un número de ciclo más temprano que se esperaría para la reacción inhibida. Estos factores causan que la representación del logaritmo (concentración) como una función de FCN esté peor descrita por una función de ajuste de curva lineal. Aunque pueden aplicarse funciones de ajuste de curva de orden más alto para una curva normalizada, un ajuste lineal requiere menos niveles de calibración y es más sencillo de calcular.

15 Algunos de estos problemas pueden resolverse en un análisis de curva normalizado incorporando un ERV o valor de intensidad en las relaciones de cuantificación como se ha tratado anteriormente. De este modo, las ecuaciones anteriores pueden reescribirse:

$$\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{Intensidad Ajust.}}) \propto \frac{\text{Intensidad}}{(1+e)^{\text{FCN}}}$$

$$\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{MR Ajust.}}) \propto \frac{\text{MR}}{(1+e)^{\text{FCN}}}$$

20 donde *Intensidad* representa la intensidad de respuesta (anteriormente fondo) en el valor de FCN determinado, MR representa el valor de MR como se ha descrito anteriormente.  $\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{Intensidad Ajust.}})$  representa la estimación de la concentración inicial de objetivo determinada usando el valor de FCN ajustado, usando el valor de intensidad y  $\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{MR Ajust.}})$  representa la estimación de la concentración inicial de objetivo determinada usando el valor de FCN ajustado usando el valor de MR.

25 Estas expresiones aprovechan la relación observada entre la intensidad en el ciclo de FCN seleccionado o la MR determinada en el ciclo de FCN seleccionado, o ambas, y el cambio para el valor de FCN en presencia de inhibición como se ha tratado anteriormente. El efecto neto es que el lado derecho de las expresiones de proporcionalidad anteriores es relativamente insensible a la inhibición y otros factores que afectan a la curva de amplificación de PCR, y por lo tanto, proporcionan una robustez significativa como expresiones para determinación de los valores de concentración del objetivo.

La siguiente discusión explica además las propiedades y relaciones de FCN,  $\text{FCN}_{\text{Intensidad Ajust.}}$  y  $\text{FCN}_{\text{MR Ajust.}}$ . Asumiendo que la eficacia es 1, lo anterior puede simplificarse a:

$$\text{Conc}_0(\text{FCN}) \propto \frac{1}{2^{\text{FCN}}}$$

$$\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{Intensidad Ajust.}}) \propto \frac{\text{Intensidad}}{2^{\text{FCN}}}$$

$$\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{MR Ajust.}}) \propto \frac{\text{MR}}{2^{\text{FCN}}}$$

Tomando logaritmos en base 2 de las expresiones se obtiene:

$$\text{Log}_2(\text{Conc}_0(\text{FCN})) \propto \text{FCN}$$

$$\text{Log}_2(\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{Intensidad Ajust.}})) \propto \text{FCN} - \text{Log}_2(\text{Intensidad})$$

$$\text{Log}_2(\text{Conc}_0(\text{FCN}_{\text{MR Ajust.}})) \propto \text{FCN} - \text{Log}_2(\text{MR})$$

De los lados de la derecha de las expresiones vienen los valores para la compensación de la intensidad o de MR para ajustar el valor de FCN por medio de las siguientes fórmulas:

$$FCN_{\text{Intensidad Ajust.}} = FCN - \text{Log}_2 (\text{Intensidad})$$

$$FCN_{\text{MR Ajust.}} = FCN - \text{Log}_2 (\text{MR})$$

5 Este cálculo proporciona entonces la cuantificación usando valores de FCN ajustados análogos al uso de valores de FCN o valores de  $C_t$ . Debería observarse que el uso de estos valores ajustados de FCN proporcionan una robustez significativa para la inhibición y otros factores que afectan a la amplificación de PCR, tales como los valores de  $C_t$  utilizados en la determinación de las concentraciones de objetivo en las muestras desconocidas. La representación del Logaritmo (concentración) frente a estos valores ajustados de FCN generalmente está bien ajustada por una curva normalizada lineal. De este modo, la presente invención proporciona un método para la determinación de la cantidad de ácido nucleico objetivo en una muestra que comprende involucrar las etapas (a) encontrar el periodo de tiempo o número de ciclo de una reacción de amplificación correspondiente a un máximo de un valor relacionado con la eficacia, preferiblemente de MR, y (b) ajustar ese valor restando el logaritmo de la intensidad o el logaritmo de MR, y (c) comparar el valor obtenido con los datos de calibración obtenidos usando la misma metodología.

Ejemplo 14 – Calibración de una Curva Normalizada

20 El desarrollo de una curva normalizada de concentraciones conocidas y el uso de la misma para la cuantificación son bien conocidos en la técnica y puede además entenderse del siguiente ejemplo. En un caso típico, varias reacciones de calibración (tales como las de huecos en los cuales las concentraciones iniciales son conocidas) se usan durante cada amplificación o una serie de amplificaciones para realizar la operación de calibración. Un problema que se presenta con el intento de cuantificación de un ácido nucleico objetivo en una muestra a través de un gran intervalo de concentraciones iniciales posibles es que la cuantificación de bajas cantidades de ácido nucleico objetivo en cualquier reacción particular se hace más difícil. Por ejemplo, la FIG. 14 ilustra datos para un ensayo diseñado para cuantificar la cantidad de HIV en las muestras de test. Las reacciones se realizaron con ocho réplicas de seis concentraciones conocidas de ácido nucleico objetivo, que eran 50; 500; 5.000; 50.000; 500.000; y 5.000.000 copias por ml. Los datos del ensayo muestran una supresión de señal significativa en las reacciones donde el número de copias es bajo (las curvas más lejos de la derecha). Mientras que la cantidad de las cuatro concentraciones más altas de ácido nucleico objetivo (conjuntos de curvas a la izquierda) obtuvo resultados precisos con bajos coeficientes de variabilidad, las dos concentraciones más bajas obtuvieron curvas menos precisas. La imprecisión causada por las dificultades en la cuantificación de bajas concentraciones de ácidos nucleicos objetivo en ensayos que tienen un intervalo dinámico de 100.000 a 1 o más puede resolverse por los siguientes métodos de esta invención.

35 Debido a que las calibraciones realizadas en una placa de reacción son relativamente caras, es convencional recoger un número mínimo aceptable de conjuntos de datos de calibración. Por ejemplo en una implementación, la media de dos replicaciones de cada una de las muestras de 500; 50.000; y 5.000.000 copias/ml están corriendo junto con los ensayos de diagnóstico, requiriendo por lo tanto quizás seis huecos en una placa de 96 huecos a utilizar para las reacciones de calibración.

40 Debido a que la relación entre el número de ciclos y el logaritmo de la concentración del calibrador es sustancialmente lineal, puede realizarse una regresión lineal entre un logaritmo (por ejemplo,  $\log_{10}$ ) de las concentraciones del calibrador y el número de ciclo. Esta regresión puede realizarse fácilmente mediante el programa Excel y otro software de análisis matemático. La FIG. 15 ilustra cuatro curvas lineales normalizadas generadas a partir de datos de calibración de tres puntos usando cuatro valores relacionados con el diferente número de ciclos (por ejemplo,  $FCN$ ,  $FCN_2$ ,  $FCN_{MR \text{ Ajust.}}$ , y  $FCN_{Int. \text{ Ajust.}}$ ).

50 En cada una de las ecuaciones de ajuste de curva, el eje x representa los valores del  $\text{Log}_{10}$  [objetivo] real o de una concentración conocida. De este modo, la resolución para x proporciona una expresión para convertir los valores relacionados con el número de ciclo con el  $\text{Log}_{10}$  [objetivo] de la concentración de ensayo calculada. Si la respuesta de ensayo no es lineal con el Log [objetivo], puede usarse una regresión de orden superior o más compleja, o mayor número de reacciones de calibración, o ambos. En este ejemplo, se determinaron las siguientes ecuaciones:

$$FCN = -3,0713 * \text{Log}_{10}(\text{Conc}_0) + 31,295$$

$$FCN_2 = -3,0637 * \text{Log}_{10}(\text{Conc}_0) + 25,006$$

55  $FCN_{MR \text{ Ajust.}} = -3,2344 * \text{Log}_{10}(\text{Conc}_0) + 33,271$

$$FCN_{Int. \text{ Ajust.}} = -3,2870 * \text{Log}_{10}(\text{Conc}_0) + 32,775$$

Ejemplo 15 – Comparación de Cuantificación Usando Diferentes Valores Relacionados con el Número de

Ciclo

Para examinar las diferentes características de las calibraciones usando los diferentes valores relacionados con el número de ciclo descritos anteriormente, puede realizarse la cuantificación sobre diversas muestras que tienen concentraciones conocidas, y compararse las concentraciones calculadas con las concentraciones conocidas. En un ejemplo de tal comparación, se usaron las curvas normalizadas que tienen los parámetros generados por encima de los que se usaron para realizar la cuantificación de las respuestas del ensayo mostradas en la FIG. 14. La media de las concentraciones calculadas de las ocho réplicas en cada concentración conocida se compararon con el valor de la concentración conocida. La FIG. 16 compara el  $\log_{10}$  de los valores de concentración conocidos (eje x) con la media del  $\log_{10}$  de cada una de las concentraciones calculadas para las ocho muestras en cada concentración.

Como se indica por la FIG. 16, las muestras de 50 copias/ml (log concentración = 1,7) están ligeramente sobre-cuantificadas (es decir, más altas que la concentración real) usando FCN, mientras que la precisión para el método de FCN (de la MR) a concentraciones más altas es muy buena. FCN2 es más preciso en la concentración más baja, pero algo infra-cuantificada (es decir, más bajo que la concentración real), y exhibe menos linealidad y precisión en algunas concentraciones más altas. FCN<sub>MR Ajust.</sub> se mostró muy precisa y cuantificación lineal a través de todo el intervalo de concentración. FCN<sub>Int. Ajust.</sub> también mostró una mejora sustancial en la precisión y linealidad en comparación con FCN, excepto por una ligera infra-cuantificación en la concentración más baja. Por consiguiente, los cuatro métodos funcionan bien, pero algunos son mejores que otros para situaciones particulares. Por lo tanto el técnico especialista puede seleccionar fácilmente un método apropiado para cualquier aplicación particular para obtener resultados excelentes.

Ejemplo 16 – Cuantificación Usando la Calibración de Un Punto

La calibración de un punto puede usarse para la cuantificación. En este caso, se usaron dos huecos con una concentración de 50.000 copias/ml (Log(4,7)) para calibración. Para calcular la constante de calibración, se usa la siguiente ecuación:  $K = Conc_0 * 2^{FCN}$ , donde K representa la constante de calibración, Conc<sub>0</sub> representa la concentración conocida del calibrador, FCN representa el número de ciclo fraccional del calibrador, y la eficacia de la reacción, e, como se describió anteriormente, se asume que es 1. Constantes de calibración similares pueden generarse usando las relaciones de proporcionalidad tales como FCN, FCN2, FCN<sub>MR Ajust.</sub>, y FCN<sub>Int. Ajust.</sub>.

En este caso, la constante se generó para dos huecos y se uso el promedio. Una vez generada la constante de calibración, la concentración para cada ensayo se calcula con la siguiente ecuación:

$$Conc = \frac{K_{FCN}}{2^{FCN}}$$

La FIG. 17 ilustra el resultado de una calibración de un punto.

Como puede verse, los resultados de FCN son elevados en las dos concentraciones más bajas y precisas desde el logaritmo (Conc.) igual a 3,7 y por encima. FCN2 muestra una precisión mejorada a bajas concentraciones en comparación con FCN, pero infra-cuantifica en el logaritmo (Objetivo) igual a 5,7 y 6,7. FCN-MR ajustado muestra una buena linealidad sobre todo el intervalo con una ligera sobre-cuantificación en las dos concentraciones más bajas. FCN-Intensidad ajustado también muestra buena linealidad con una muy ligera infra-cuantificación en las dos concentraciones más bajas. Por consiguiente, cada una de estas realizaciones funciona bien y los técnicos especialistas pueden seleccionar fácilmente de entre estas opciones.

Como se ha tratado anteriormente, puede usarse un análisis FCN-MR para caracterizar una reacción particular como positiva o negativa o para comparar la reacción con los datos de criterios, o ambas cosas. Estos valores pueden usarse para cuantificar una reacción. Una diversidad de métodos de cuantificación puede beneficiarse del análisis de FCN-MR más bien que del análisis de C<sub>t</sub>.

En una realización, pueden usarse un valor de FCN, un valor de FCN2, o un valor de FCN ajustado del modo que se ha usado un valor de C<sub>t</sub> en la técnica anterior. Típicamente, pero no necesariamente, FCN-ajustado, FCN2-ajustado, o el análisis FCN-ajustado pueden aplicarse a diversos conjuntos de datos de calibración para desarrollar por lo tanto curvas de datos de referencia o una ecuación para comparar el resultado de una reacción en la cual la concentración del objetivo es desconocida con los resultados de las reacciones en las cuales la concentración de objetivo es conocida. De este modo, la presente invención puede usarse para desarrollar los datos de referencia y para realizar una comparación en la que se usan dos valores (por ejemplo FCN-MR) para desarrollar datos de referencia y también para realizar una comparación con esos datos.

Aunque los experimentos que usan el método de MR utilizaron regularmente diferentes etapas

de pre-procesamiento sobre el conjunto de datos capturados antes del procesamiento del conjunto de datos con una función de proporciones, la mayor parte de estas etapas no se requieren. En particular, los resultados experimentales han indicado que la puesta a escala, la normalización por un tinte de referencia, el alineamiento base (tanto la corrección del desplazamiento como de la pendiente), y el filtrado no se requieren. Sin embargo, se ha encontrado que el filtrado generalmente es deseable ya que mejora el funcionamiento en presencia de ruido. La corrección de pendiente (para la región de la línea base) se ha encontrado que es deseable ya que mejora ligeramente la discriminación entre muestras que no contienen ácido nucleico objetivo y las que contienen muy poco ácido nucleico objetivo o sufren de una inhibición significativa de la reacción de amplificación. Generalmente, sin embargo, cuando se usa FCN<sub>Intensidad Ajust.</sub>, es preferible usar una técnica de normalización, tal como, pero sin limitarse a estas, la puesta a escala, o la normalización para un tinte de referencia.

Ejemplo 17 – Algoritmo de MR Aplicado a Datos de HBV Usando una Calibración de Un punto.

Ensayos de HBV de soluciones de control que varían desde 10 copias/reacción hasta 10<sup>9</sup> copias/reacción y negativas se procesaron sobre un Prisma ABI 7000 con seis réplicas en cada concentración. Los datos capturados se procesaron usando sólo un filtro digital. A continuación se calcularon los valores de FCN usando un algoritmo de MR como se ha descrito anteriormente. Se calcularon las concentraciones por medio de una calibración de un punto usando las tres respuestas de 10<sup>9</sup> copias/reacción como calibrador de referencia.

Incluso sin normalización, puesta a escala, o alineación de base, el resultado de la cuantificación fue muy bueno, con la excepción de una aceptable cantidad de sobre-cuantificación de las muestras de 10 copias/reacción y 100 copias/reacción (es decir, las muestras de Log (Objetivo) = 1 y 2). Había una clara distinción entre los ensayos negativos y los ensayos de 10 copias/reacción, sin ningún falso positivo o negativo. Resultados adicionales indicaron cuando los mismos datos se cuantificaron con análisis de C<sub>t</sub>, los ensayos de 10 copias/reacción y 100 copias/reacción también se sobre-cuantificaron ligeramente, y la precisión en todas las concentraciones por encima de 10 copias/reacción es mejor con los análisis de MR. En este caso, los resultados de C<sub>t</sub> se normalizaron, se alinearon de base y se calibraron por medio de una calibración de dos puntos con tres réplicas para cada una de las concentraciones de 10<sup>5</sup> y 10<sup>7</sup> copias/reacción.

La FIG. 19 ilustra un ejemplo de los mismos datos de HBV usando un análisis de MR y con corrección FCN<sub>MR Ajust.</sub>. De nuevo, la cuantificación se realizó por medio de una calibración de un punto con tres respuestas en 10<sup>9</sup> copias/reacción sin normalización, puesta a escala o alineamiento de base. Como puede verse, la sobre-cuantificación de las concentraciones bajas se reduce significativamente, es decir, los resultados cuantitativos se mejoran significativamente.

Ejemplo 18 - Algoritmo de MR Aplicado a Datos de HIV

En este ejemplo, se realizaron ensayos de HIV de una solución de control a concentraciones negativas, de 50 copias/ml, y 100 copias/ml, hasta 10<sup>6</sup> copias/ml en réplicas de seis. Las respuestas se procesaron por medio del algoritmo de MR usando FCN<sub>MR Ajust.</sub> con normalización y alineamiento de base. La FIG. 21 ilustra resultados del ejemplo usando análisis de MR y calibración de dos puntos, por ejemplo usando dos réplicas de respuesta de 10<sup>2</sup> y 10<sup>5</sup> copias/ml. como calibradores. Hubo una clara diferenciación entre los ensayos negativos y 50 copias/ml sin ningún falso positivo ni falso negativo. Como puede verse, hubo una buena linealidad y precisión.

Ejemplo 19 – Determinación de Validez Usando Pares de Objetivo y de IC (FCN, MR)

Se ha encontrado que los pares de valores de tiempo de reacción o números de ciclos y los valores relacionados con la eficacia (por ejemplo pares de valores de FCN-MR) pueden proporcionar información valiosa acerca de una reacción de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, una reacción PCR, que puede mejorarse adicionalmente considerando pares de datos tanto para las reacciones de amplificación de control interno como de objetivo. Aunque los pares para la reacción objetivo solos aportan información importante acerca de la eficacia de la reacción y pueden usarse para su comparación con datos de criterios, factores adicionales que surgen en el procesamiento de muestras o en las propias muestras pueden analizarse mejor considerando también los datos de control.

Por ejemplo, en el procesamiento de muestras para su uso en PCR o en otras reacciones de amplificación adecuadas, la muestra puede transportar diversos inhibidores dentro de la reacción, lo cual podría detectarse mediante la evaluación de sólo datos de control. Sin embargo, la recuperación anormal del ácido nucleico objetivo durante la preparación de la muestra típicamente no se detectaría por el análisis de una simple reacción de amplificación. Además, un ácido nucleico objetivo puede poseer secuencias polimórficas que podrían mejorar la detección del ácido nucleico objetivo, por ejemplo, si se usa una sonda que se vincula con una región polimórfica de la secuencia. Las coincidencias causadas por la secuencia polimórfica en esa región afectarían a la señal detectada, y, por consiguiente la amplificación puede que no aparezca como anormal o inhibida usando la evaluación de los pares de datos para una simple amplificación. El co-análisis de un control interno junto con el análisis de respuestas de

amplificación de objetivo puede proporcionar una cuantificación precisa de ácido nucleico objetivo en tales muestras cuando otros métodos indicarían típicamente una reacción inválida.

De este modo, pueden usarse pares juntos valores de tiempo de reacción o número de ciclos y valores relacionados con la eficacia para evaluar la validez de una reacción determinada, tal como en un contenedor o hueco determinado. Podría diseñarse la reacción de amplificación de control interno (IC) para que fuese comparable en robustez con la reacción de amplificación de objetivo, o ligeramente menos robusta. La robustez en este contexto significa la sensibilidad del funcionamiento de la reacción a factores que pueden afectar al recorrido del procesamiento de PCR, tal como la inhibición que resulta de la preparación de la muestra o de las propias muestras, o para la variabilidad en la transferencia de la mezcla de reacción por la pipeta, tal como transfiriendo cantidades imprecisas de reactivos de amplificación por pipeta.

Ejemplo 20 – Curvas de Datos de Criterios Múltiples

Las curvas de criterios múltiples para los pares de valores del número de ciclo – valor relacionado con la eficacia (por ejemplo, los pares FCN-MR) pueden desarrollarse y pueden tener usos diferentes o niveles de importancia, en particular para el uso con la determinación de la validez. Por ejemplo, puede seleccionarse una primera curva de criterios de modo que sea capaz de discriminar las señales de amplificación reactivas de las respuestas no reactivas. Puede seleccionarse una segunda curva de criterios de modo que sea más restrictiva que la primera, de modo que sería útil en la identificación de respuestas de muestras que conducen a la cuantificación precisa en contraste con las que tienen una inhibición parcial que podrían tener una confianza más baja en la cuantificación. La FIG. 22 es una representación que ilustra dos tipos de datos de criterios, en la que la línea horizontal más inferior representa datos de criterios adecuados para la diferenciación negativa de las reacciones reactivas. El segundo conjunto de líneas representa datos de criterios que indican el intervalo normal para las respuestas de los pares FCN-MR. Estos criterios pueden usarse para distinguir una alta confianza en la cuantificación en contraste con una confianza más baja que podría estar asociada con un valor fuera de este rango debido a una inhibición parcial de la reacción.

Por ejemplo, el primer tipo de datos de criterios que diferencia la reacción de amplificación reactiva de la no reactiva puede denominarse como "datos de criterios de MR". Estos datos actúan como un umbral de corte – las respuestas reactivas tendrán valores de MR que excederán los datos de criterios de MR, mientras que las muestras negativas tendrán valores de MR que no excederán el valor de criterio o la línea de criterio. Los datos de criterios se fijan preferiblemente de modo que el ruido en la señal de respuesta no excede el criterio, ni tendencias tales como el acoplamiento o el solapamiento.

El segundo tipo de datos de criterios se denomina como el intervalo normal de MR. Este intervalo sería el intervalo de valores de MR para un FCN determinado sobre el cual es precisa la cuantificación de la muestra. Si se suprime una respuesta de señal, el valor de MR observado caerá. Como el valor de MR disminuye debido a la inhibición, el valor de FCN puede desplazarse hacia ciclos más tempranos, mientras que el umbral basado en  $C_t$  podría desplazarse a ciclos posteriores. El intervalo normal de MR sería el intervalo para valores de MR en un conjunto de datos de criterios para el cual el valor elegido relacionado con el número de ciclo proporcionaría un resultado cuantitativo preciso para la muestra cuando se usa para determinar la concentración de objetivo en la muestra a partir de la curva normalizada de ensayo.

El "intervalo normal de MR" puede desarrollarse usando un Ajuste Bi-variable (Bivariate Fit) de MR por FCN como se entenderá en la técnica. La FIG. 23, por ejemplo, muestra una representación de FCN-MR para datos HIV desde 50 copias/ml hasta 5.000.000 copias/ml. Los datos se analizaron por medio de un paquete software de estadísticas (tal como JMP (Instituto SAS, Inc.)) para aplicar un ajuste de curva cúbica a los datos. Este ajuste de curva cúbica se representa por la línea continua en medio de la figura. Las curvas superior e inferior discontinuas representan el intervalo de confianza generado usando la opción de análisis individual de intervalos de confianza con un nivel de alfa de 0,001. Las TABLAS 2A, 2B, y 2C ilustran la entrada de datos de muestras y la salida relacionada con la FIG. 23.

TABLA 2A

Resumen de Ajuste	
RCuadrada	0,971668
RCuadrada Ajust.	0,969737
Raíz del Error Cuadrático Medio	0,023918

Media de la Respuesta	0,401317
Observaciones (o Suma de Pond)	48
Grado de Ajuste de Polinomio = 3	
MR = 0,6710196 – 0,0101107 FCN	
– 0,003987 (FCN – 18,3056)^2	
– 0.0004202 (FCN – 18,3056)^3	

TABLA 2B

Análisis de la Varianza				
Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Proporcion F
Modelo	3	0,86331003	0,287770	503,0120
Error	44	0,02517212	0,000572	Prob > F
C.Total	47	0,88848215		< 0,0001

TABLA 2C

Estimaciones de Parámetros				
Término	Estimación	Error Cuadr.	Proporción t	Prob >  t
Interceptación	0,6710196	0,036617	18,33	< 0,0001
FCN	-0,010111	0,002006	-5,04	< 0,0001
(FCN – 18,3056)^2	-0,003939	0,000198	-19,92	< 0,0001
(FCN – 18,3056)^3	-0,00042	0,000047	-8,93	< 0,0001

- 5 Un intervalo de confianza derivado estadísticamente, como se muestra, es un enfoque sistemático para determinar qué puntos de datos representan respuestas normales y deberían por lo tanto cuantificarse. Los puntos de datos que caen fuera de este intervalo son excepcionales y preferiblemente se identifican al operario por un programa de software modo que puede realizarse una investigación adicional.
- 10 En realizaciones alternativas, tal curva puede simplificarse, en la forma de uno o más segmentos de línea recta. Esta simplificación puede realizarse en algunos casos por un técnico que está viendo los datos sin procesar o puede deducirse a partir de un intervalo alfa como se ha tratado anteriormente.
- 15 Un ajuste estadístico similar puede realizarse sobre los datos de control interno (IC). La FIG. 24, por ejemplo, muestra una representación de MR como una función de FCN para los datos IC, a saber los datos IC asociados con los datos mostrados en la FIG. 23. Estos datos pueden usarse para determinar un criterio de IC, que por ejemplo, puede ser un valor único que está cinco desviaciones estándar por debajo de la media de los valores de MR del IC o puede ser un intervalo o caja de valores, por ejemplo, basado en la media  $\pm$  5 desviaciones estándar de los valores de MR y de FCN.
- 20 De este modo, la presente invención también proporciona un método para analizar una reacción de amplificación, comprendiendo el método el establecimiento de un "corredor de confianza", que es un intervalo de valores seleccionados proporcionado en pares en los cuales el primer valor es un valor relacionado con la eficacia máxima (que es preferiblemente la MR), y el segundo valor es un valor de tiempo o valor del número de ciclo en un punto de la reacción (que opcionalmente puede ser fraccional).

El método comprende además determinar si un valor de eficacia máximo que ocurre en cualquier valor del tiempo periódico particular o valor del número de ciclo en un punto de la reacción (que opcionalmente puede ser fraccional) cae dentro del intervalo seleccionado. Si no es así, entonces se indica la investigación adicional, o el descarte de resultados. Puede usarse cualquier método adecuado para establecer el corredor de confianza seleccionado. Los métodos preferidos incluyen el establecimiento del corredor de confianza aproximadamente 1, 2, 3, 5, 10, o cualquier otro número adecuado de desviaciones estándar desde la media de los datos obtenidos a partir de un conjunto de reacciones utilizadas para caracterizar el ensayo. Otro método adecuado involucra la modificación del corredor de confianza observando resultados conocidos como aberrantes o discrepantes y la modificación del corredor de confianza para excluir una porción de esos resultados aberrantes o discrepantes en futuros ensayos. El uso del corredor de confianza de la presente invención puede aplicarse a la cuantificación del ácido nucleico objetivo, el análisis de cualesquiera normalizaciones, calibradores, controles o combinaciones de los anteriores.

#### Ejemplo 21 – Análisis de Validez

La FIG. 25 es un diagrama de flujo que ilustra un árbol de análisis lógico para la evaluación de la validez de ensayos mediante el análisis de parejas de números de ciclos (por ejemplo, FCN) frente a ERV (por ejemplo, MR) para ambas reacciones amplificación de control interno y de objetivo. La FIG. 26 es un diagrama de flujo que ilustra un árbol de análisis lógico para reportar los resultados de objetivo con una evaluación de los criterios de validez usando pares de números de ciclos (por ejemplo FCN) frente a ERV (por ejemplo, MR). En los diagramas de flujo FCN se usa para claridad de la ilustración, pero como se observa en otras partes en este documento, pueden usarse otros métodos para generar el valor del punto de la reacción, por ejemplo, el método de  $C_t$ , FCN2,  $FCN_{MR \text{ Ajust.}}$ , o  $FCN_{Int. \text{ Ajust.}}$ , u otro método adecuado.

De este modo, una comprobación de validez puede proceder opcionalmente como una serie de cuestiones relativas al control interno (IC) y/o datos del objetivo.

En la FIG. 25, los bloques con forma de flecha de más a la izquierda proporcionan descripciones generales de las etapas del método. Pueden entenderse detalles del método adicionales considerando lo siguiente. El método analiza un par de número de ciclo/ERV tanto de una reacción de objetivo como de control (IC). Inicialmente, si (1) la MR de IC está por encima de los datos de criterios de MR de IC, y a continuación si (2) el FCN de IC está dentro del rango normal, y además si (3) la MR de IC está dentro del rango normal, entonces se confirma la validez de la reacción.

Como se muestra en la figura, un resultado inválido puede caracterizarse o explicarse además considerando una o más características de la MR del objetivo.

La FIG. 26 ilustra un método para el análisis de los datos de objetivo para reacciones válidas para caracterizar adicionalmente un resultado válido como indicativo de (1) una muestra de objetivo no reactiva, (2) un objetivo con una concentración menor que el límite de detección del ensayo, (3) un objetivo presente pero con una cuantificación inhibida, posiblemente debido a un desajuste del sub-tipo, o (4) una reacción de objetivo válida, cuantificable.

De este modo, combinando el análisis basado en objetivos múltiples y usando ambos valores del número de ciclos y el relacionado con la eficacia, puede distinguirse una muestra inhibida de una muestra que sufre de una recuperación del ácido nucleico pobre durante la preparación de la muestra. El análisis hace uso del conocimiento preestablecido del ensayo que está contenido en los datos de criterios de control interno y del objetivo.

#### Ejemplo 22 – Determinación de la Validez Usando el Ancho de Pico

En contraste con el análisis convencional de  $C_t$  en la técnica anterior, que sólo presenta un valor único describiendo una respuesta de amplificación, un análisis de un valor relacionado con la eficacia (y preferiblemente un análisis de MR) puede proporcionar una curva de transformada relacionada con la eficacia con datos correspondientes al valor del tiempo o el valor del número de ciclos de toda la reacción de amplificación o cualquier porción de la misma. Se ha descubierto que dentro de una formulación del ensayo específico, las respuestas normales del ensayo generan curvas de transformadas relacionadas con la eficacia altamente reproducibles. Una característica en particular es el ancho del pico de la curva de transformada relacionada con la eficacia. Se ha encontrado que el ancho del pico de la transformada relacionada con la eficacia, por ejemplo, como se define por su ancho en la mitad de la altura máxima, varía muy poco incluso cuando la magnitud de la intensidad de la fluorescencia varía enormemente.

Cualquier método adecuado puede usarse para determinar el ancho del pico del valor relacionado con la eficacia. La FIG. 27 representa un método adecuado para la determinación del ancho de un pico del valor relacionado con la eficacia. En la FIG. 27, el ancho del pico total es el ancho en ciclos del pico en su nivel mitad del máximo. Las respuestas de HIV en la FIG. 14, muestran la fluorescencia normalizada para muestras de concentración más alta en aproximadamente 8, mientras que la fluorescencia normalizada para las muestras de baja concentración es tan baja como aproximadamente 1.

Usando el método de proporciones desplazadas para calcular una transformada relacionada con la eficacia para cada reacción de amplificación y calculando el ancho del pico total proporciona los resultados mostrados en la FIG. 28. Incluso con un cambio de ocho duplicaciones en la intensidad de la fluorescencia final, los anchos de pico se conservan sorprendentemente dentro de un intervalo estrecho. Por consiguiente la presente invención proporciona criterios de validez de la reacción de amplificación, en los que una reacción de amplificación se considera válida cuando el ancho del pico de un valor relacionado con la eficacia está contenido dentro de un intervalo seleccionado característico de la reacción de amplificación. En la FIG. 28, las líneas horizontales discontinuas tipo grueso representan la media de las mediciones del ancho más y menos 10 desviaciones estándar. Las mediciones de ancho que no están dentro del intervalo de aproximadamente 5,5 y 8.0 (como se muestra en la FIG. 28) se consideran inválidas o al menos sospechosas. Los técnicos especialistas pueden variar fácilmente los parámetros describiendo el intervalo de aceptación, dependiendo de los requisitos de un ensayo particular y sin experimentación excesiva.

Los anchos de los picos pueden usarse para detectar una respuesta de ensayo anormal. El cálculo del ancho de pico total se aplicó a los datos del ensayo que contenía una respuesta anormal mostrada en la FIG. 12. Los resultados se presentan en la FIG. 29. Como puede verse, las respuestas normales para este conjunto de datos producen anchos de todo el pico entre aproximadamente 6 y 9 ciclos mientras que el ancho de pico total del hueco 42 es de 1742. Por consiguiente, la reacción de amplificación del hueco 42 es anormal y se ignora.

El cálculo del ancho de pico total estará afectado por las variaciones anormales en la respuesta de amplificación que se producen tanto antes como después del valor del punto de reacción (por ejemplo, el FCN) del valor relacionado con la eficacia. Las variaciones anormales que se producen después del valor del punto de reacción del valor relacionado con la eficacia no se consideran para un test de validez del ensayo, porque no pueden afectar la cuantificación del ensayo por el método MR. Esta opción puede conseguirse fácilmente usando el cálculo del ancho de medio pico ilustrado en la FIG 27 ó su equivalente. En el ejemplo ilustrado, sólo se usa el ancho en unidades periódicas de tiempo desde aproximadamente la mitad del máximo de la transformada relacionada con la eficacia hasta aproximadamente el valor del punto de reacción del valor relacionado con la eficacia máxima. Por supuesto, otros métodos adecuados para la medición de los anchos de pico y anchos de mitad de pico se conocen en la técnica.

#### Ejemplo 23 – Realizaciones Software

Los sistemas de esta invención pueden incorporarse en una multiplicidad de productos de ordenador adecuados o instrumentos de información. Algunos detalles de una implementación de software de MR se proporcionan a continuación. Las descripciones de la interfaz específica de usuario y las ilustraciones se toman sólo para ilustrar realizaciones específicas y puede usarse cualquiera de varios métodos de interfaz de usuario diferentes conocidos en la técnica de procesamiento de información en los sistemas de realización de esta invención. La invención puede usarse también en sistemas donde se programan virtualmente todas las opciones descritas más adelante, calculadas, o proporcionadas por un sistema de información, y consecuentemente, proporcionan pocas o ninguna opción de la interfaz de usuario. En algunos casos, se describen detalles y/o opciones de un sistema prototipo para propósitos de ejemplificación; muchas de estas opciones y/o detalles puede que no sean relevantes o estén disponibles para un sistema de producción.

Además, las realizaciones software pueden incluir diversas funcionalidades, tales como, por ejemplo, el procesamiento de reacciones con una o dos reacciones objetivo, o una o más reacciones de control interno, o datos de referencia, o combinaciones de las anteriores. Un sistema de software adecuado para su uso en esta invención puede proporcionar cualquier número de ficheros normalizados de manejo de funciones tales como abrir, cerrar, imprimir, almacenar, etc.

La FIG. 30 ilustra una interfaz de usuario para el procesamiento de datos de PCR de acuerdo con esta invención. En esta interfaz, la selección de los tintes apropiados correspondientes al ensayo objetivo, el control interno, y las respuestas de referencia se seleccionan de listas de ventanas emergentes en la porción superior izquierda de la ventana. Las etiquetas para la selección de diferentes opciones de vistas se posicionan en el medio de la ventana y están dispuestas horizontalmente. La FIG. 30 muestra que se ha seleccionado la etiqueta que presenta la representación de MR-FCN. La FIG. 31 ilustra una interfaz de usuario que muestra los mismos datos para el hueco 1, pero que representa la curva de proporciones desplazada. Otras etiquetas permiten ver los datos de la fluorescencia sin elaborar, la fluorescencia normalizada, y los datos de la línea de base para todas las respuestas. Además, una etiqueta permite la inspección de cada respuesta individualmente. Los campos de la derecha de la representación muestran los valores de respuesta calculados tales como MR, FCN,  $C_t$ , y la desviación estándar de la región de la línea base. Por debajo de estos valores calculados están los botones de selección que permiten al usuario representar bien los datos del ensayo o los datos de control interno.

#### Realización en una Aplicación de Información Programada

La FIG. 32 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo de un dispositivo lógico en el cual

pueden realizarse diversos aspectos de la presente invención. Como se entenderá de las enseñanzas proporcionadas en este documento, la invención puede implementarse en hardware o software o ambos. En algunas realizaciones, pueden implementarse diferentes aspectos de la invención bien en la lógica del lado de cliente o la lógica del lado del servidor. Además la invención o componentes de la misma pueden implementarse en un componente de programa de medios fijos que contiene instrucciones lógicas o datos, o ambos, que cuando se cargan en un dispositivo de computación configurado apropiadamente puede causar que el dispositivo funcione de acuerdo con la invención. El componente de medios fijos que contiene instrucciones lógicas puede suministrarse al espectador sobre un medio fijo para la carga física dentro del ordenador del espectador o el medio fijo que contiene las instrucciones lógicas puede residir sobre un servidor remoto al que puede tener acceso el espectador a través de un medio de comunicaciones para descargar el componente de programa.

La FIG. 32 muestra un instrumento de información o dispositivo digital 700 que puede usarse como un aparato lógico para realizar operaciones lógicas con respecto a la representación o análisis de imágenes, o ambos, como se describe en este documento. Tal dispositivo puede realizarse como un sistema de ordenador de propósito general o una estación de trabajo que corre instrucciones lógicas a realizar de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención. Tal dispositivo puede también adaptarse y/o especializarse para laboratorios o hardware científico que integran el procesamiento lógico dentro de una máquina para la realización de diversas operaciones de manejo de muestras. En general, los componentes de procesamiento lógico de un dispositivo de acuerdo con la presente invención pueden leer instrucciones del medio 717, o el puerto de red 719 o ambos. La unidad de procesamiento central puede conectarse opcionalmente al servidor 720 que tiene un medio fijo 722. El aparato 720 puede después de esto usar esas instrucciones para dirigir acciones o realizar análisis como se describe en este documento. Un tipo de aparato lógico que puede realizar la invención es un sistema de ordenador como el ilustrado en 700, que contiene una CPU 707, dispositivos de entrada opcionales 709 y 711, un medio de almacenamiento 715, por ejemplo, unidades de disco, y un monitor opcional 705. Los medios fijos 717, o los medios fijos 722 sobre el puerto 719, pueden usarse para programar tal sistema y pueden representar un medio óptico tipo disco o magnético, una cinta magnética, memoria dinámica o estática de estado sólido, etc. La invención puede también realizarse en todo o en parte como software grabado sobre este medio fijo. El puerto de comunicaciones 719 también puede usarse para recibir inicialmente instrucciones que se usan para programar tal sistema y representa cualquier tipo de conexión de comunicaciones.

La FIG. 32 muestra componentes adicionales que pueden ser parte de un sistema de diagnóstico. Estos componentes incluyen un espectador o detector 750 o microscopio, manejador de muestras 755, fuente de luz UV u otra 760 y filtros 765, y una cámara de CCD o dispositivo de captura 780 para capturar datos de señal. Estos componentes adicionales pueden ser componentes de un sistema único que incluye análisis lógico y/o de control. Estos dispositivos pueden también ser esencialmente dispositivos independientes que están en comunicación digital con un instrumento de información tal como 700 a través de una red, bus, comunicación inalámbrica, etc. como se entenderá en la técnica. Los componentes de tal sistema pueden tener cualquier configuración física y/o apariencia convenientes y pueden combinarse en un sistema integrado único. De este modo, los componentes individuales mostrados en la FIG. 42 representan sólo un sistema de ejemplo.

La invención puede también realizarse en todo o en parte dentro de la circuitería de un circuito integrado de aplicación específica (ASIC) o dispositivo de lógica programable (PLD). En tal caso, la invención puede realizarse en un lenguaje descriptor entendible por un ordenador, que puede usarse para crear un ASIC, o PLD, que opera como se describe en este documento.

#### Otras Realizaciones

La invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas. Otras realizaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica. En particular, una aplicación de un visor de información digital se ha ilustrado de forma general como una estación de trabajo de ordenador tal como un ordenador personal. Sin embargo, el dispositivo de computación digital significa que es cualquier aplicación de información adecuada para realizar los métodos lógicos de la invención, y podría incluir dispositivos tales como sistemas de laboratorios o equipos activados digitalmente, televisión activada digitalmente, teléfono celular, asistente digital personal, etc. Modificaciones dentro del espíritu de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica. Además, pueden usarse diversas acciones diferentes para efectuar interacciones con un sistema de acuerdo con las realizaciones específicas de la presente invención. Por ejemplo, puede pronunciarse un comando de voz por un operario, puede teclearse una clave por un operario, puede pulsarse un botón sobre un dispositivo científico del lado del cliente por un operario, o puede efectuarse una selección usando cualquier dispositivo de apuntamiento por el usuario.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de si una muestra de test contiene un ácido nucleico objetivo, comprendiendo el método:
- 5 (a) poner en contacto la muestra de test con un agente de amplificación para una reacción de amplificación;
- (b) amplificar al menos una porción del ácido nucleico objetivo en la muestra;
- (c) medir las señales obtenidas en diversos puntos en la reacción de amplificación, siendo las señales proporcionales a la cantidad de ácido nucleico objetivo presente;
- 10 (d) determinar una transformada relacionada con la eficacia de la reacción de amplificación, donde la transformada relacionada con la eficacia de la reacción de amplificación es la primera derivada de las señales obtenidas de la amplificación;
- (e) determinar un valor relacionado con la eficacia que es la magnitud máxima de la transformada relacionada con la eficacia; y
- 15 (f) determinar que la muestra de test contiene un ácido nucleico objetivo si el valor relacionado con la eficacia para la reacción de amplificación excede un valor seleccionado, realizándose dicha determinación si el valor relacionado con la eficacia excede un valor seleccionado comparando el valor relacionado con la eficacia con una curva de criterios, donde la curva de criterios se determina:
- realizando una pluralidad de reacciones de amplificación sobre muestras negativas, siendo dichas muestras negativas muestras que carecen del ácido nucleico objetivo;
  - 20 - determinando el valor relacionado con la eficacia para cada muestra negativa;
  - determinando la media y la desviación estándar de los valores relacionados con la eficacia de las muestras negativas; y
  - determinando que cualquier muestra que tiene cualquier valor relacionado con la eficacia que excede la media por un múltiplo seleccionado de la desviación estándar de los valores relacionados con la eficacia de las muestras negativas contiene el ácido nucleico objetivo.
- 25
2. El método de la reivindicación 1, en el que la primera derivada de las señales obtenidas desde la reacción de amplificación es igual a la diferencia entre dos señales consecutivas obtenidas desde la reacción de amplificación dividida por la magnitud del intervalo entre las señales consecutivas.
- 30
3. El método de la reivindicación 1, en el que la primera derivada de las señales obtenidas desde la reacción de amplificación se calcula por manipulación matemática de una curva ajustada a las señales obtenidas desde la reacción de amplificación.
- 35
4. El método de la reivindicación 1, en el que cualquier muestra que tiene cualquier valor relacionado con la eficacia que excede la media desde uno a aproximadamente 20 veces la desviación estándar de la transformada relacionada con la eficacia de las muestras negativas se considera que contiene ácido nucleico.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el valor seleccionado de la etapa (e) varía de acuerdo con el punto de reacción particular en el cual se produce el valor relacionado con la eficacia.
- 40
6. El método de la reivindicación 1, en el que el valor seleccionado de la etapa (e) se determina (1) amplificando una pluralidad de muestras para determinar los valores relacionados con la eficacia y (2) seleccionando un valor que es más alto que todos los valores relacionados con la eficacia para muestras negativas.
- 45
7. El método de la reivindicación 1, en el que el valor seleccionado de la etapa (e) se determina (1) amplificando una pluralidad de muestras para determinar los valores relacionados con la eficacia y (2) seleccionando un valor que separa los valores relacionados con la eficacia de las muestras negativas de los valores relacionados con la eficacia de las muestras positivas.

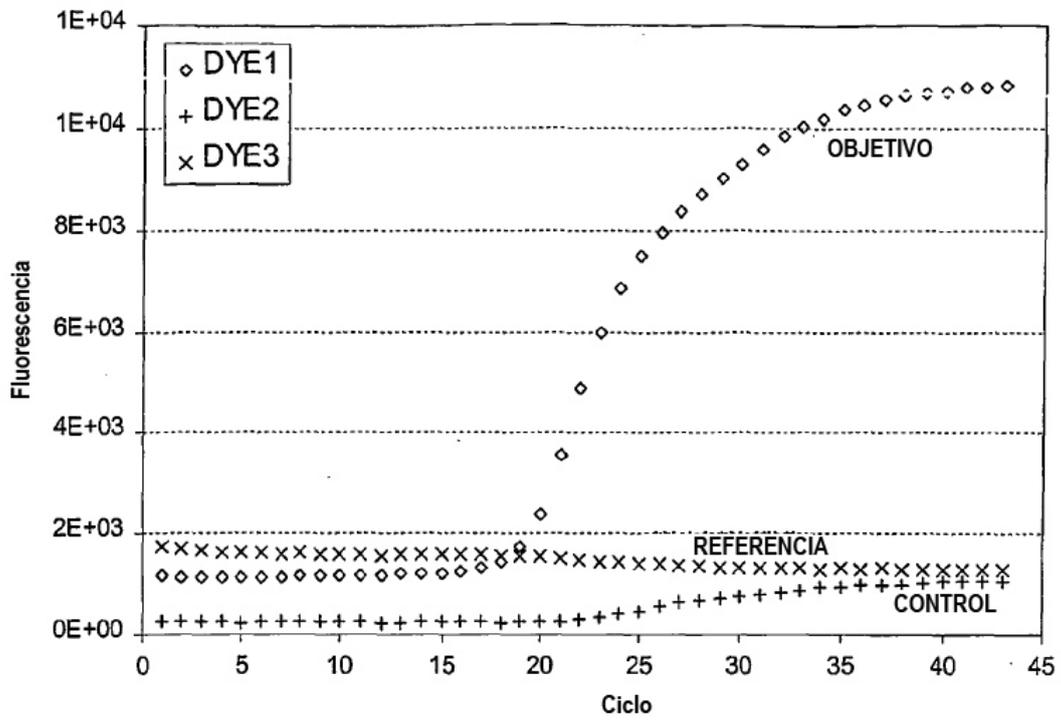


FIG. 1

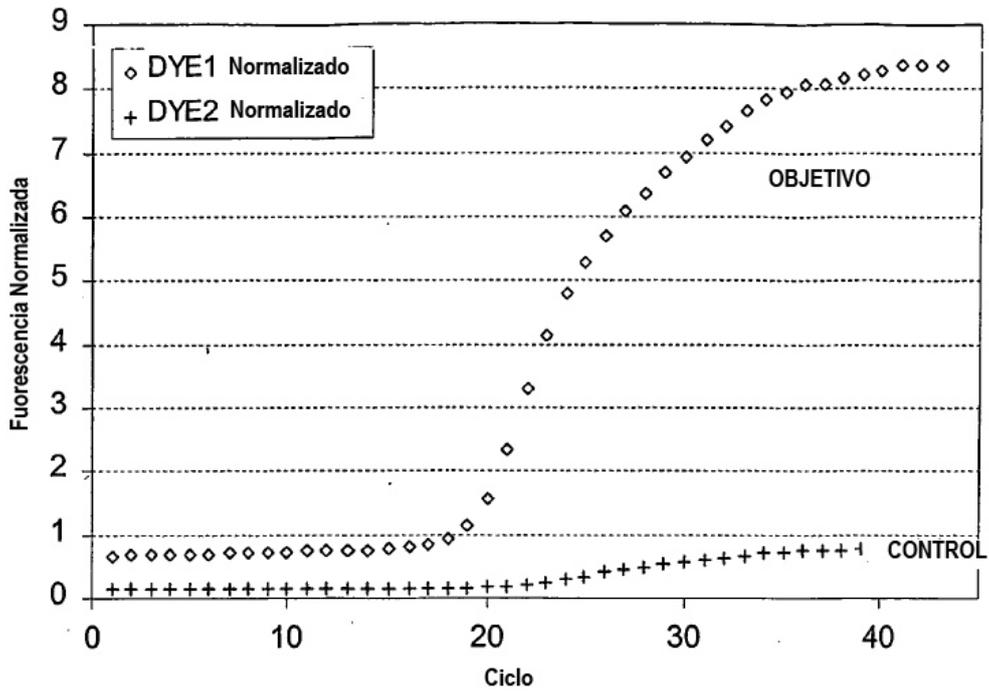


FIG. 2

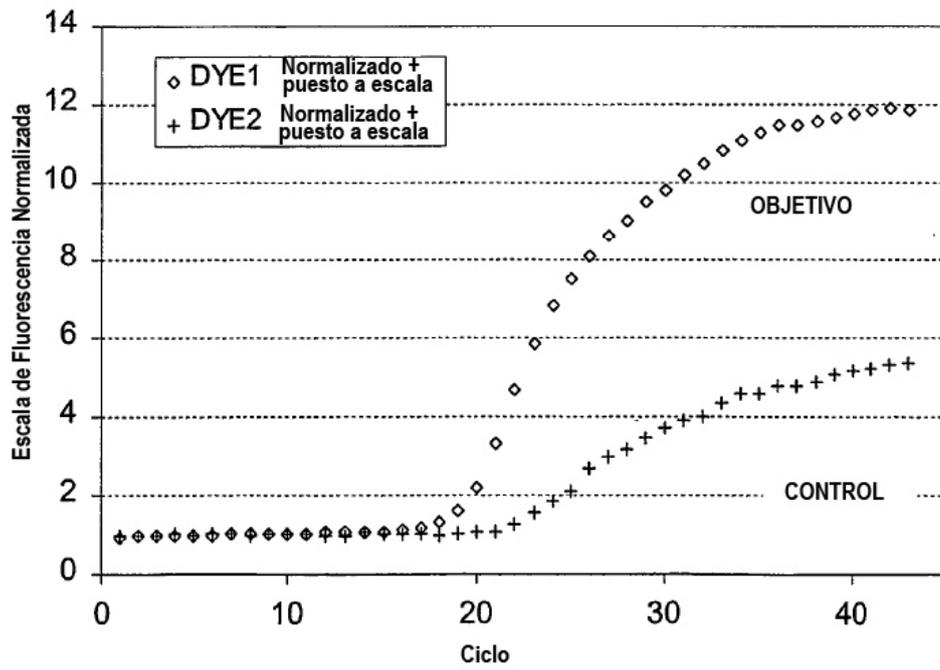


FIG. 3

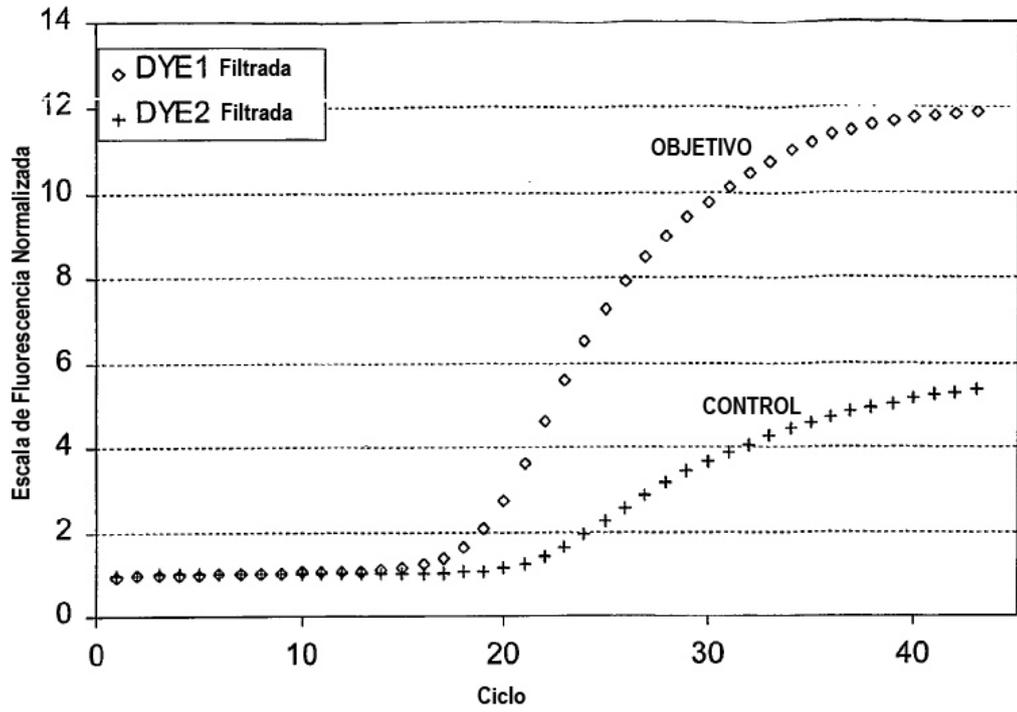


FIG. 4

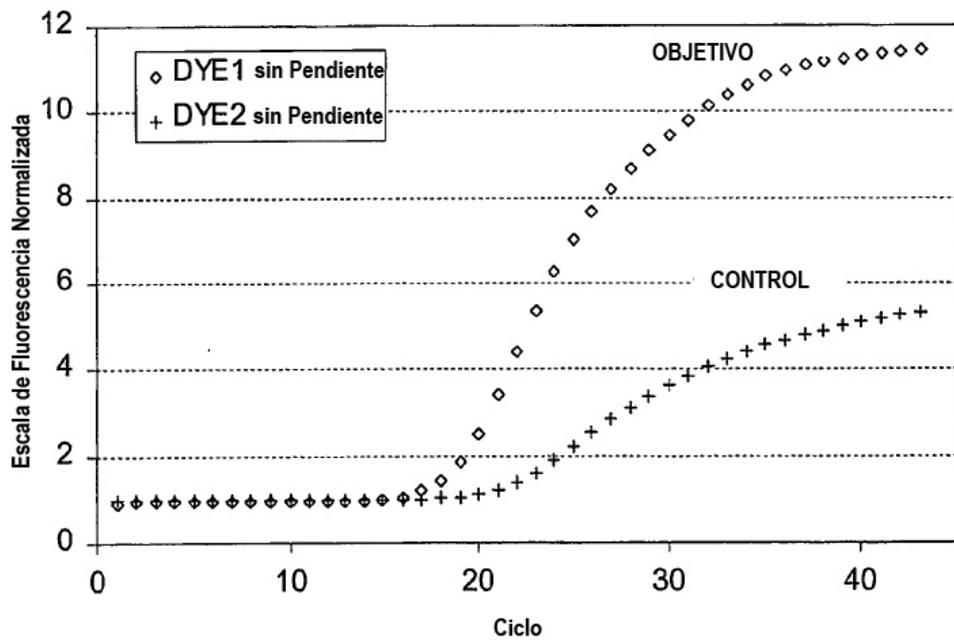


FIG. 5

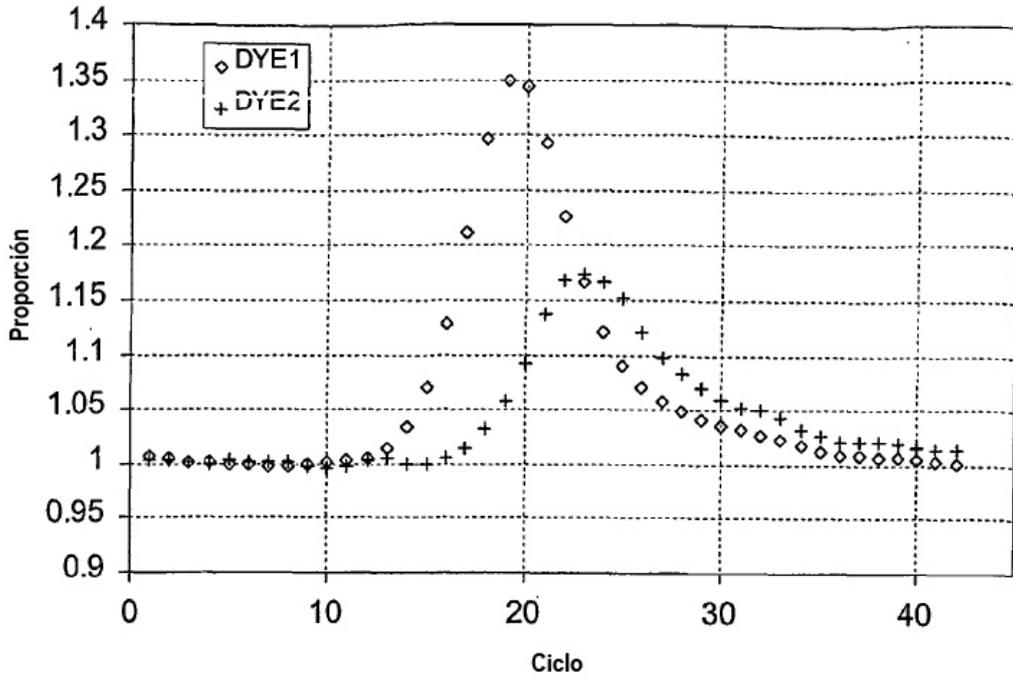


FIG. 6

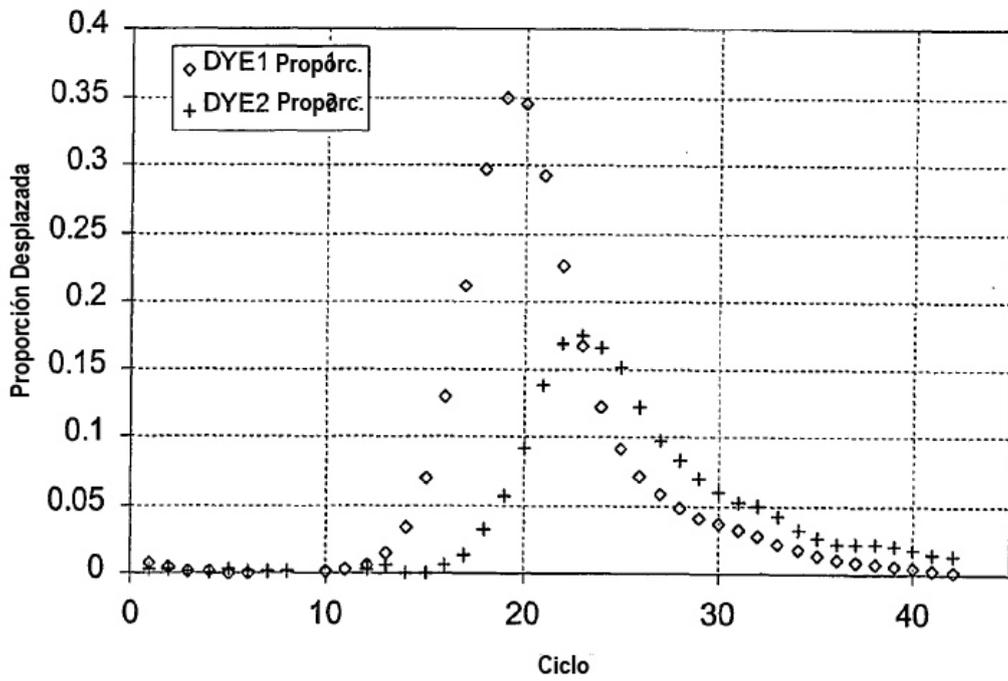


FIG. 7

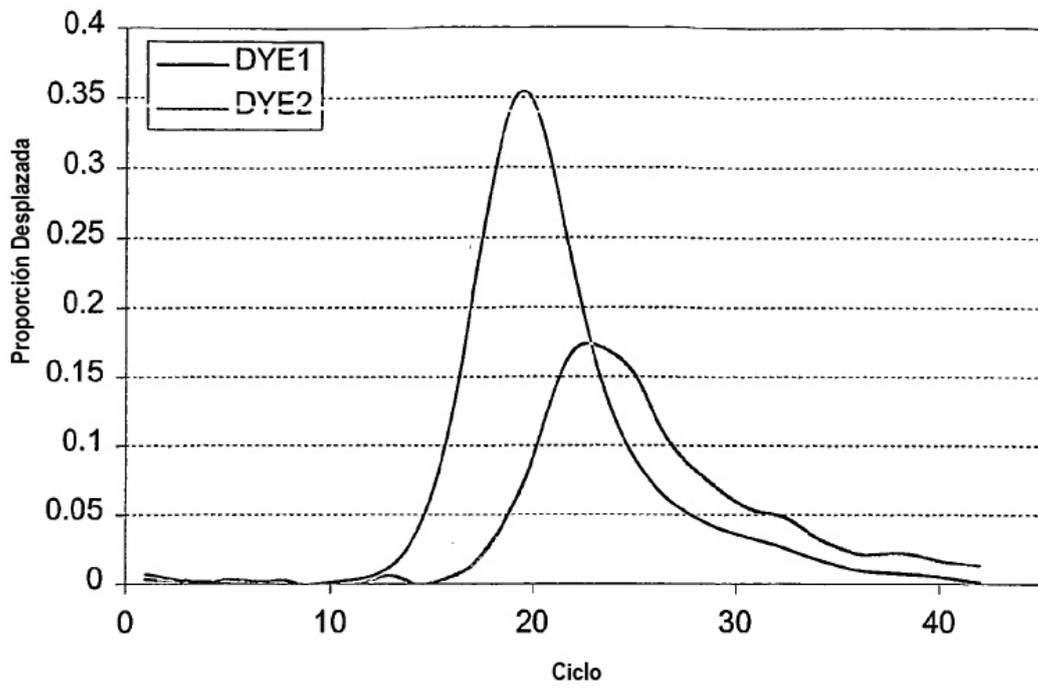


FIG. 8

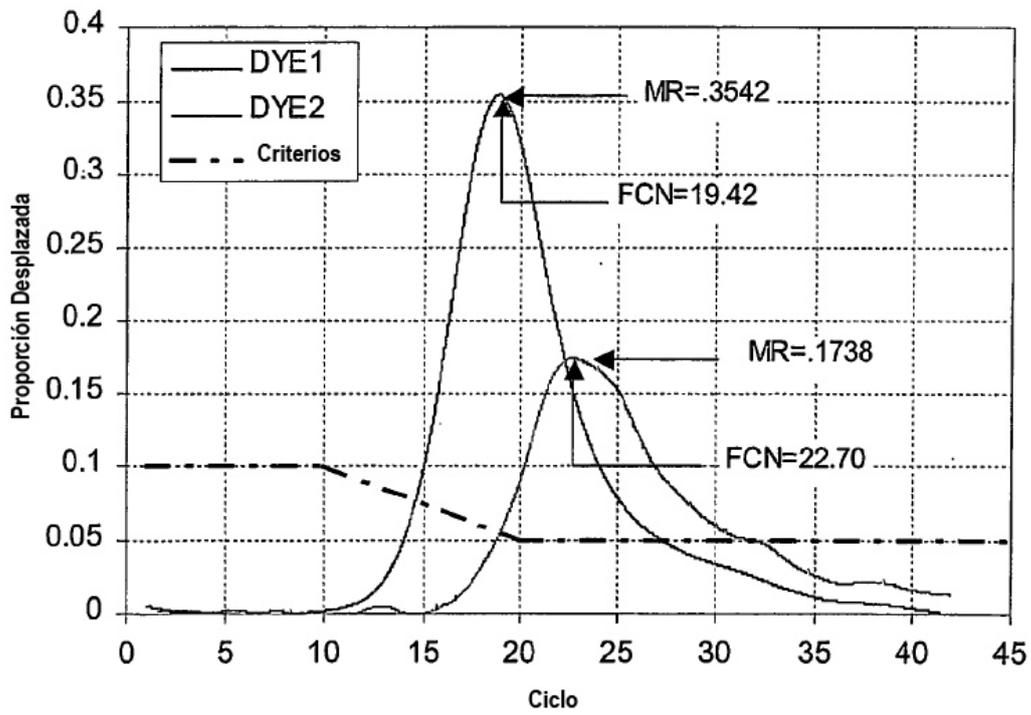


FIG. 9

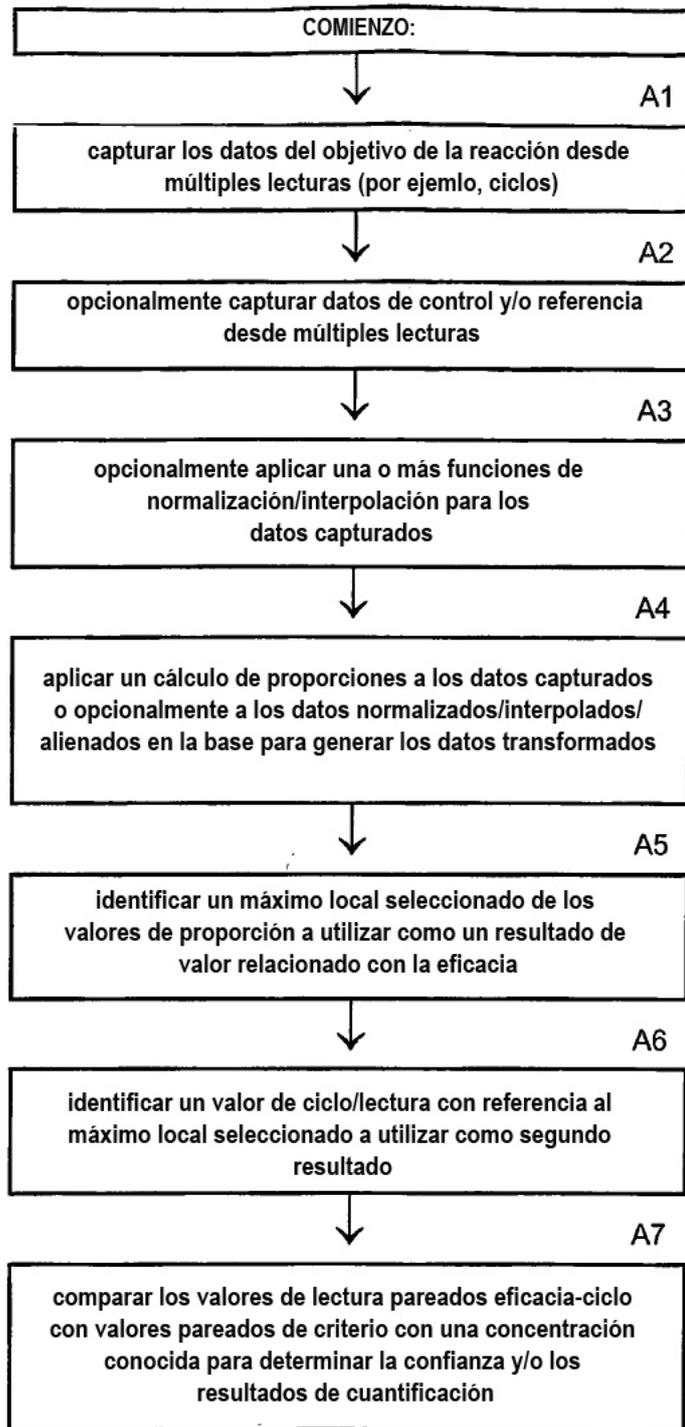


FIG. 10

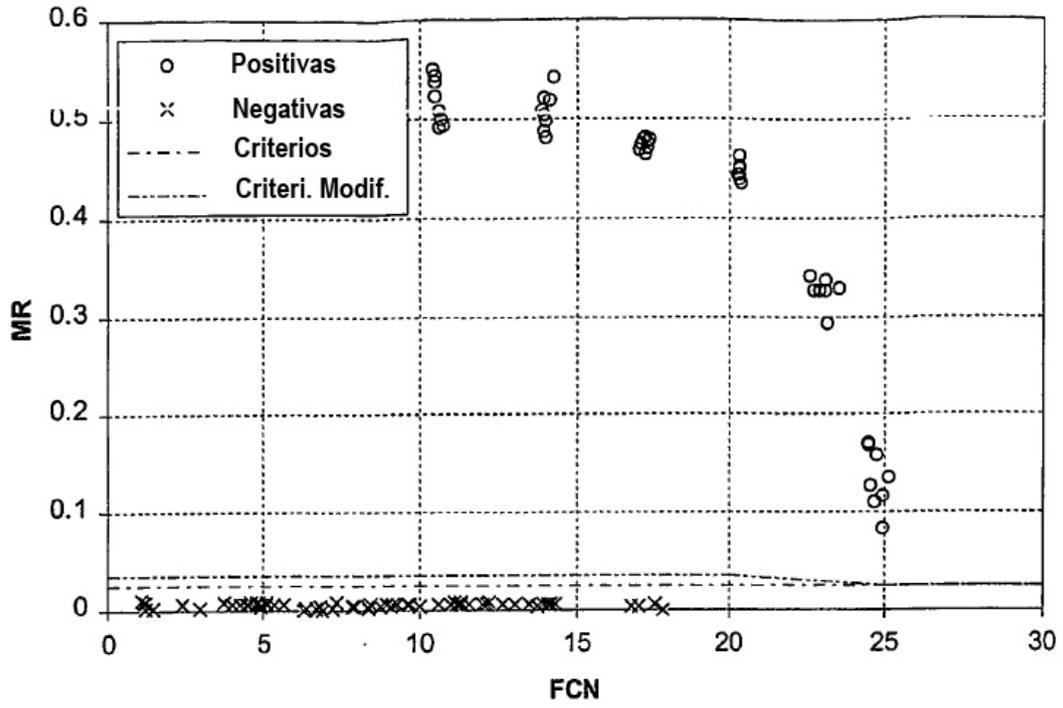
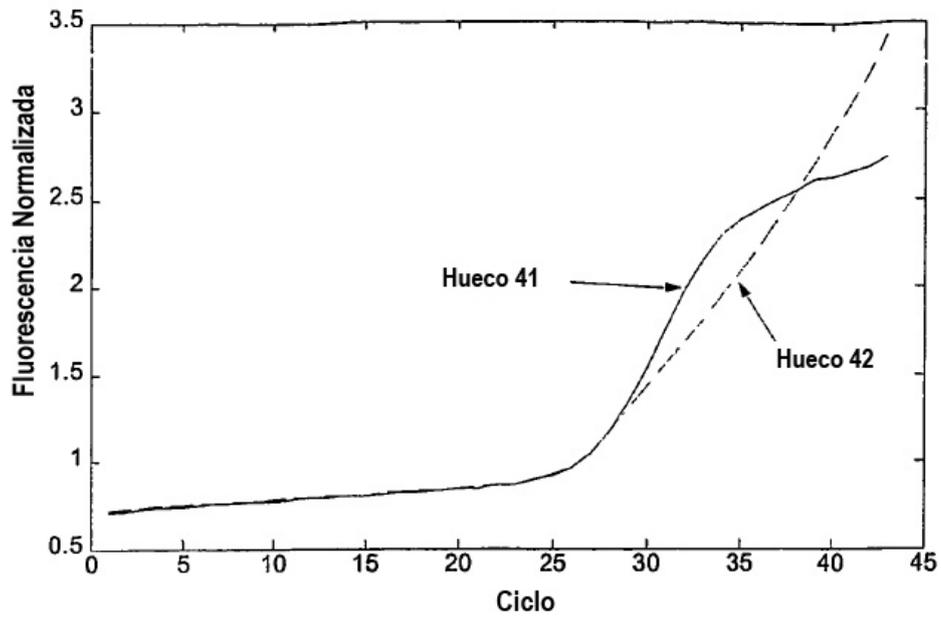
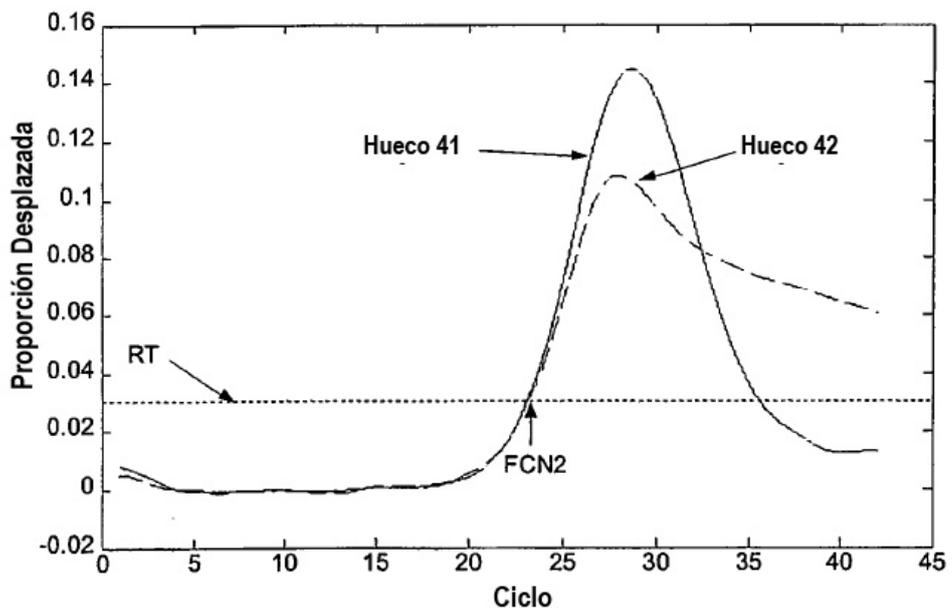


FIG. 11



**FIG. 12**



**FIG. 13**

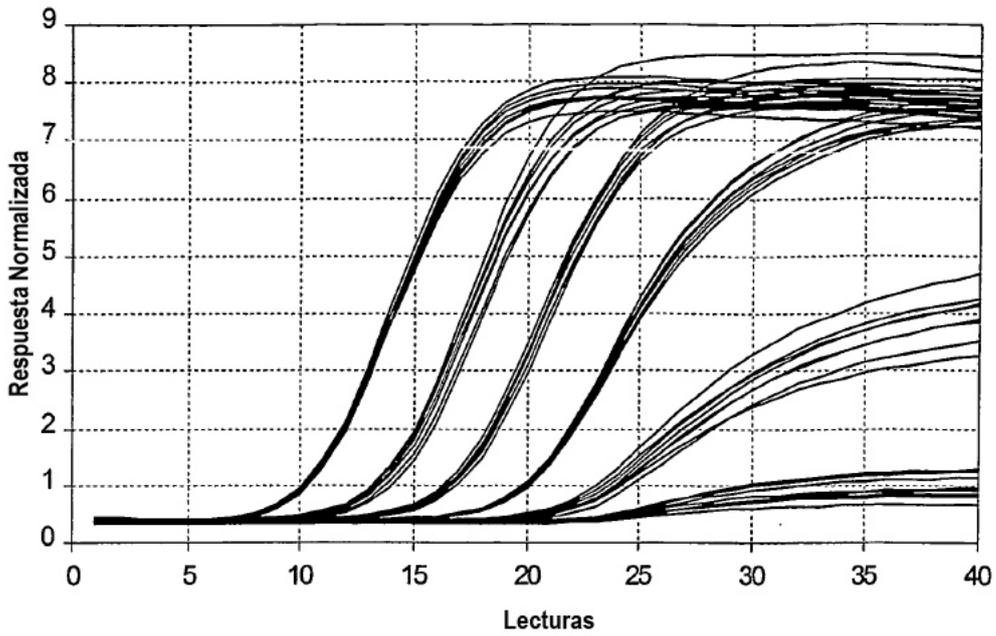


FIG. 14

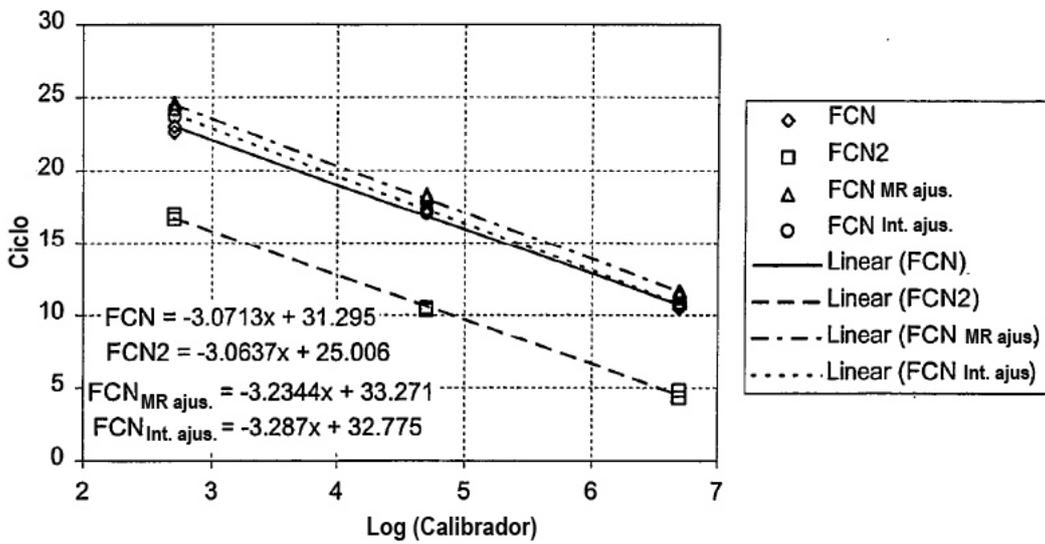
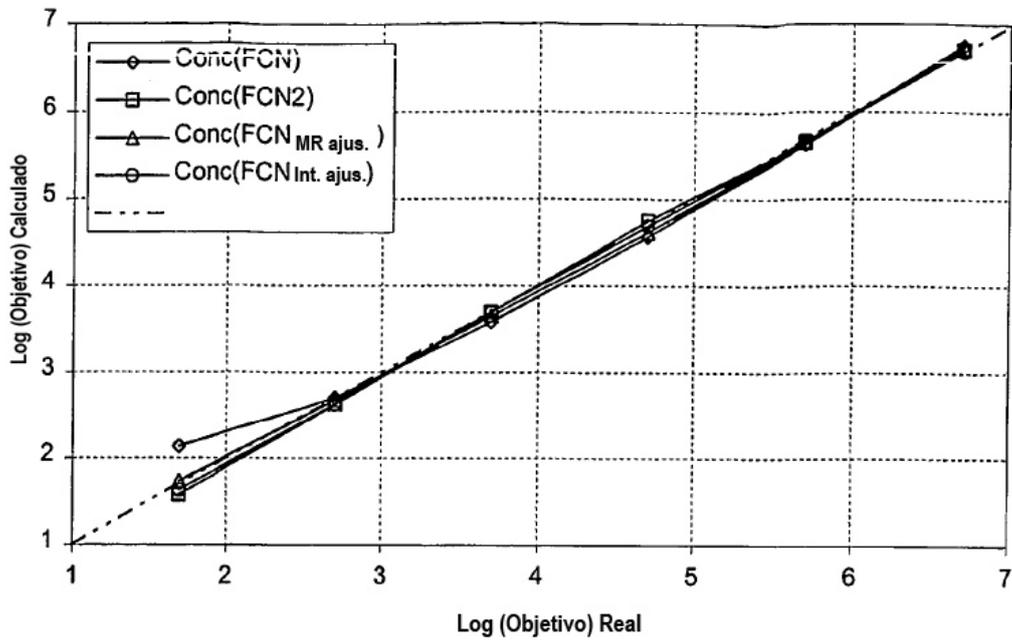


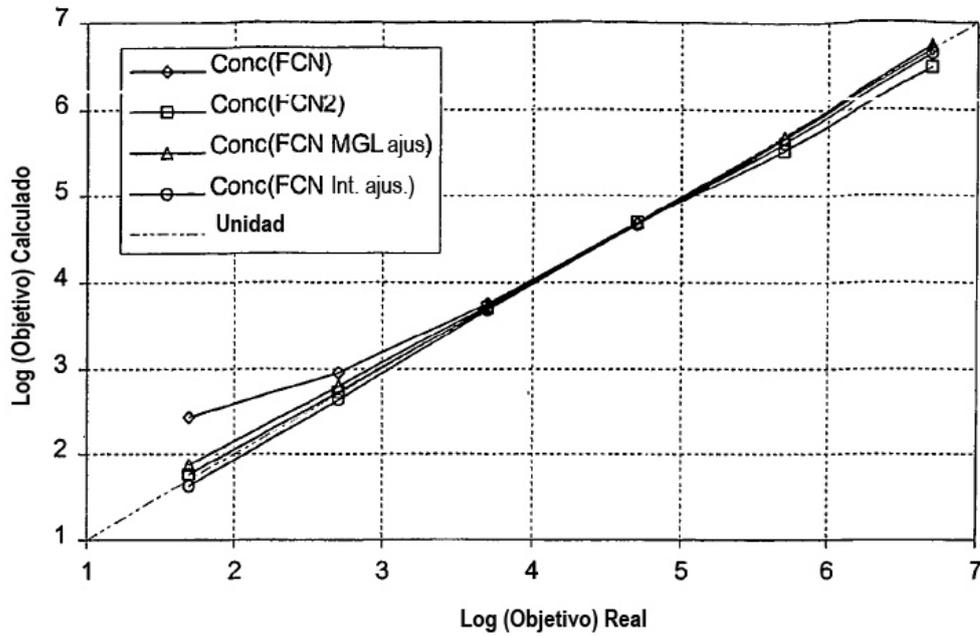
FIG. 15



Concentraciones Logarítmicas Medias

Log (Muestra)	Conc(FCN)	Conc(FCN2)	Conc(FCN <sub>MR ajust.</sub> )	Conc(FCN <sub>Int. ajust.</sub> )
1.7	2.14	1.58	1.73	1.63
2.7	2.70	2.63	2.68	2.63
3.7	3.58	3.69	3.65	3.69
4.7	4.57	4.75	4.62	4.70
5.7	5.63	5.66	5.65	5.65
6.7	6.76	6.71	6.73	6.69

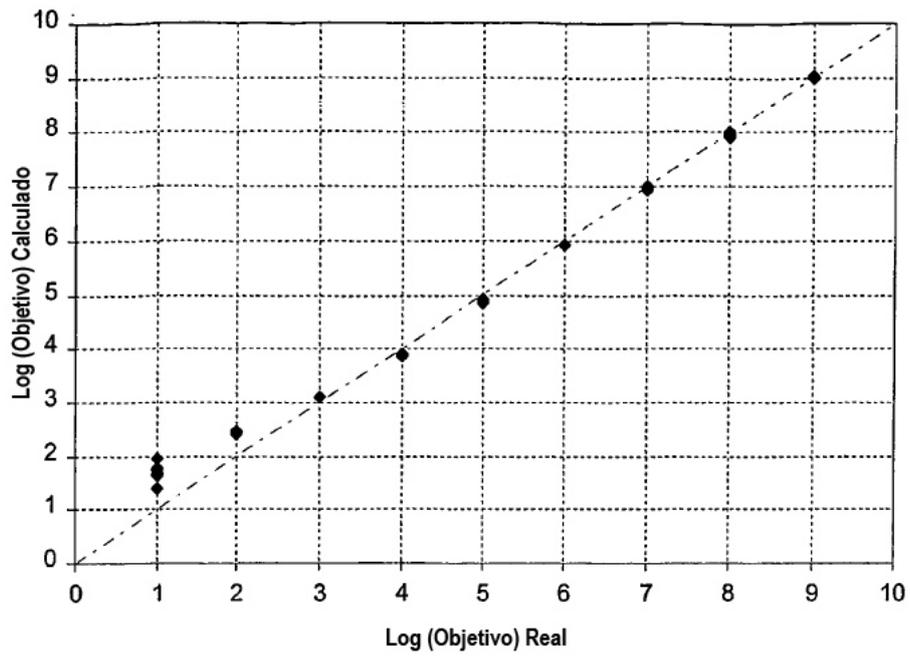
**FIG. 16** CUANTIFICACIÓN DE RESULTADOS



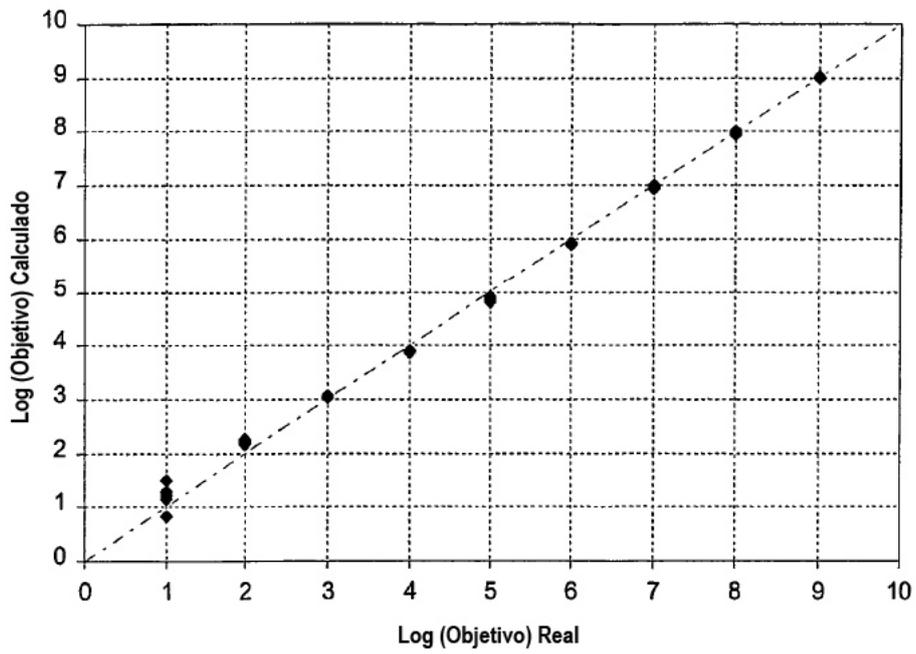
Concentraciones Logarítmicas Medias

Log (Muestra)	Conc(FCN)	Conc(FCN2)	Conc(FCN <sub>MR</sub> ajus)	Conc(FCN <sub>Int.</sub> ajus)
1.7	2.43	1.77	1.88	1.64
2.7	2.95	2.73	2.80	2.63
3.7	3.76	3.71	3.74	3.68
4.7	4.68	4.69	4.68	4.67
5.7	5.65	5.53	5.69	5.61
6.7	6.70	6.49	6.74	6.64

**FIG. 17 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN DE UN PUNTO**



**FIG. 18**



**FIG. 19**

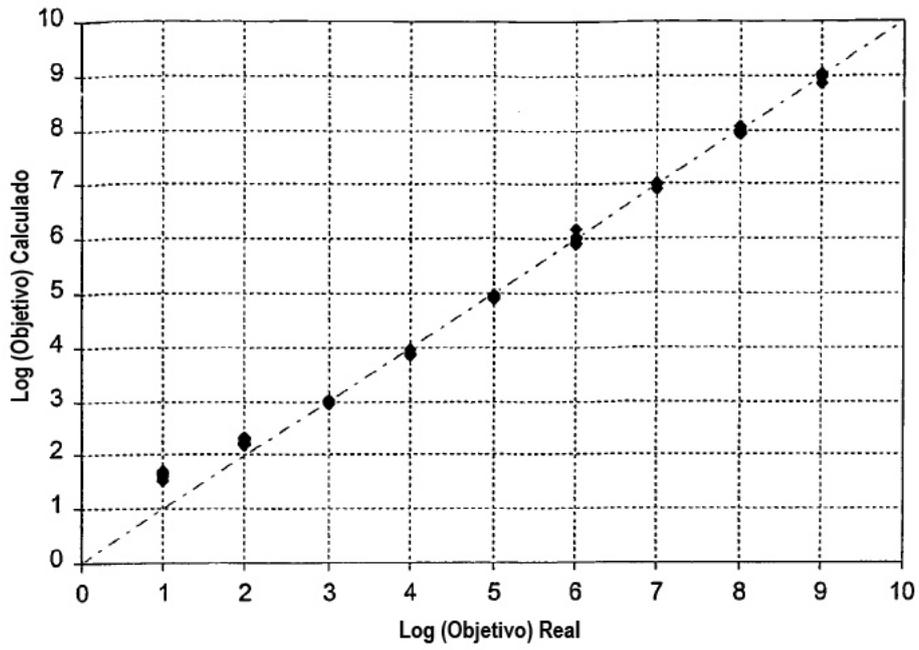


FIG. 20

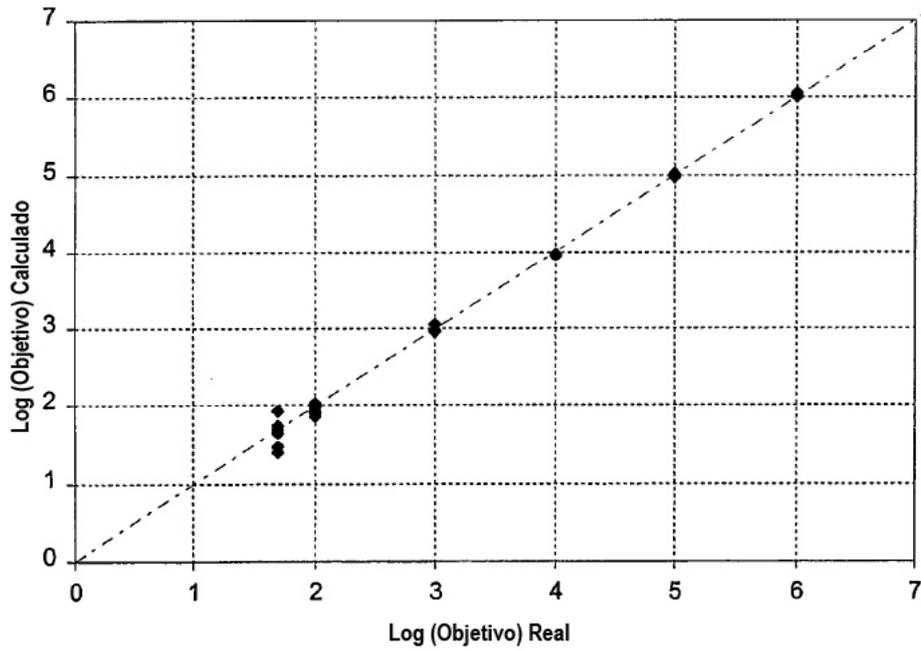


FIG. 21

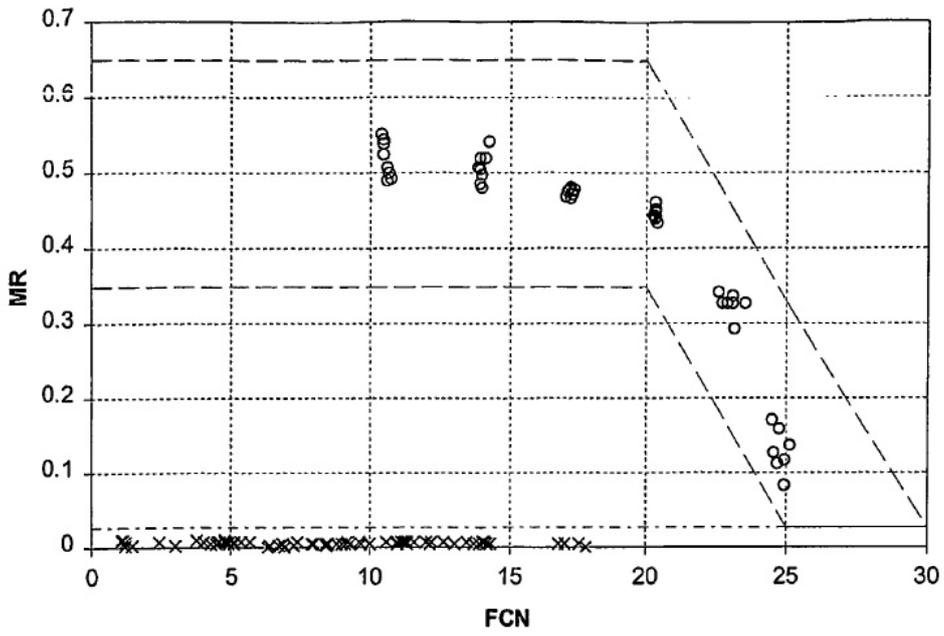


FIG. 22

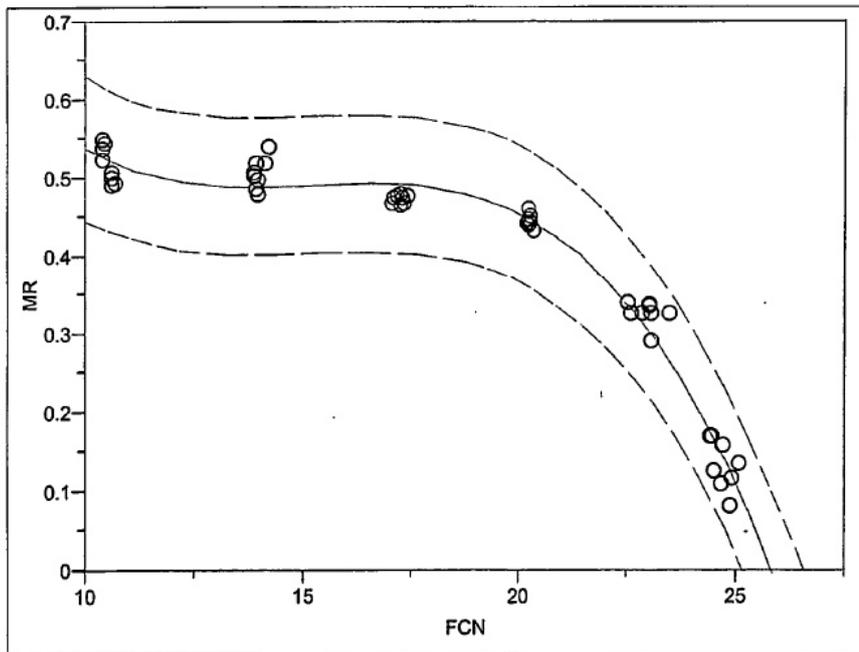
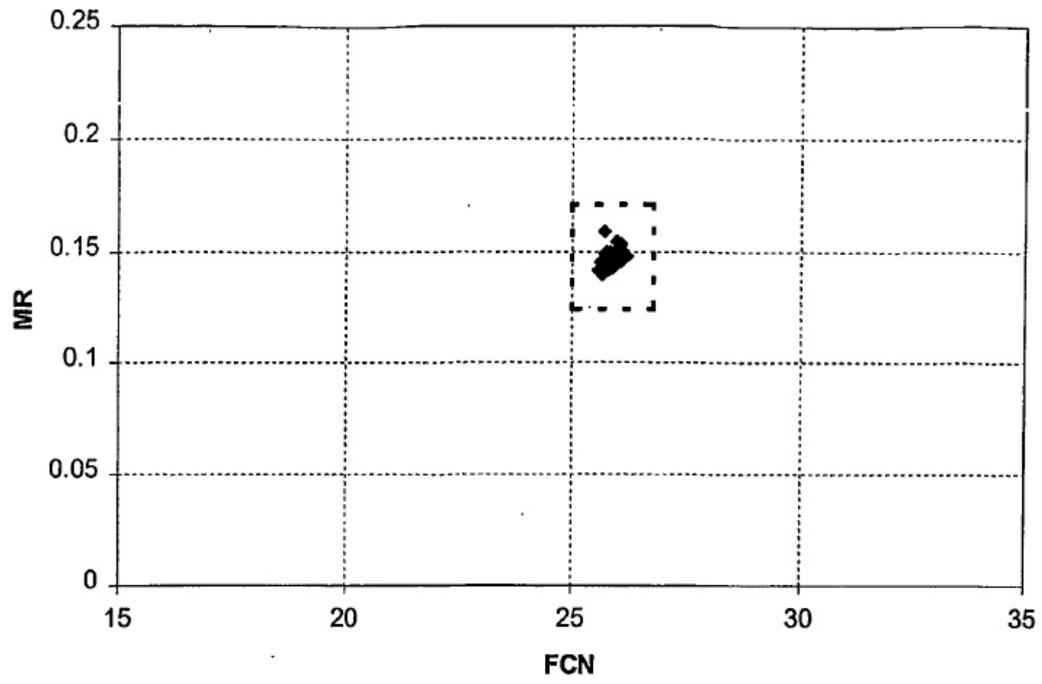


FIG. 23



**FIG. 24**

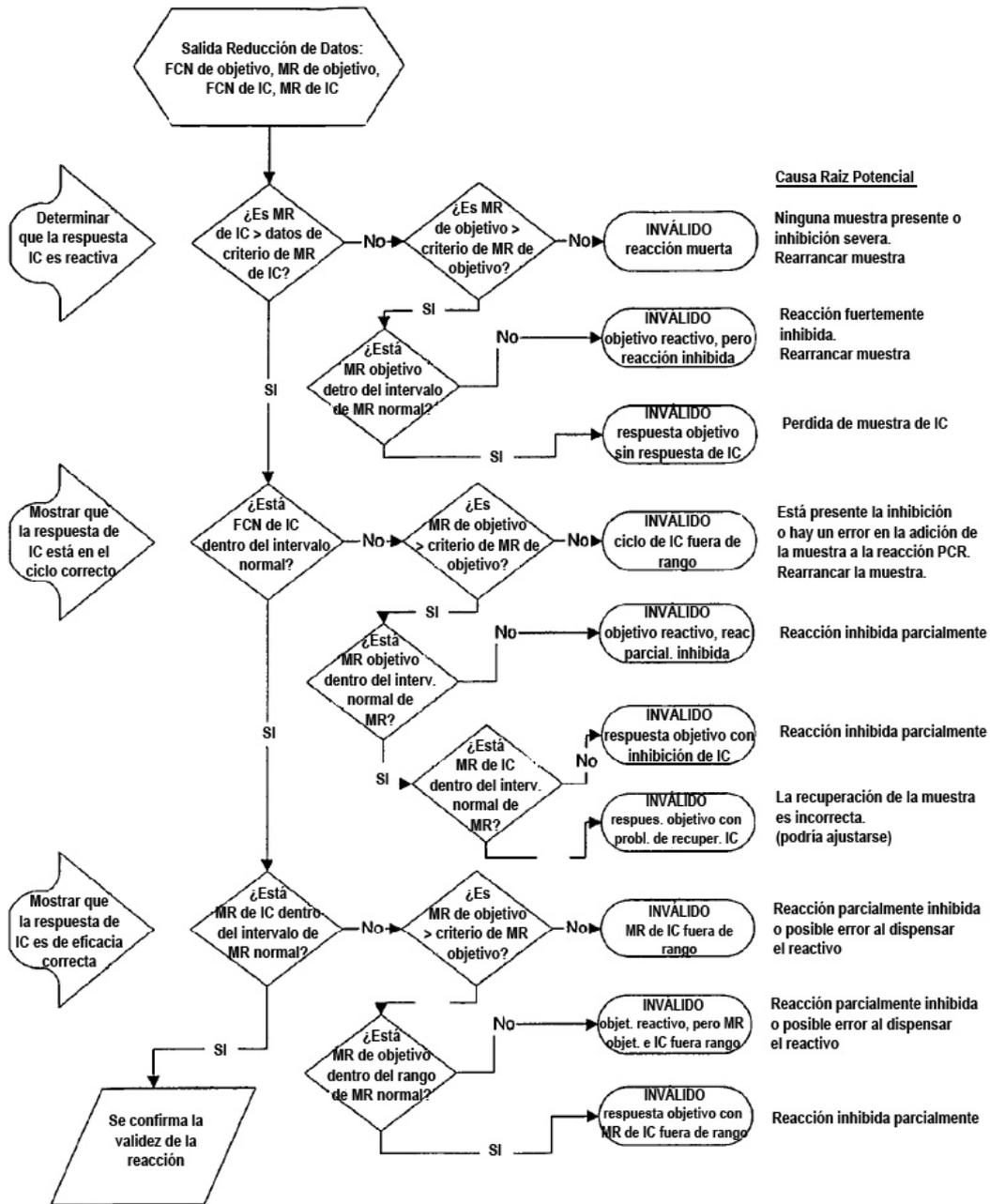


FIG. 25

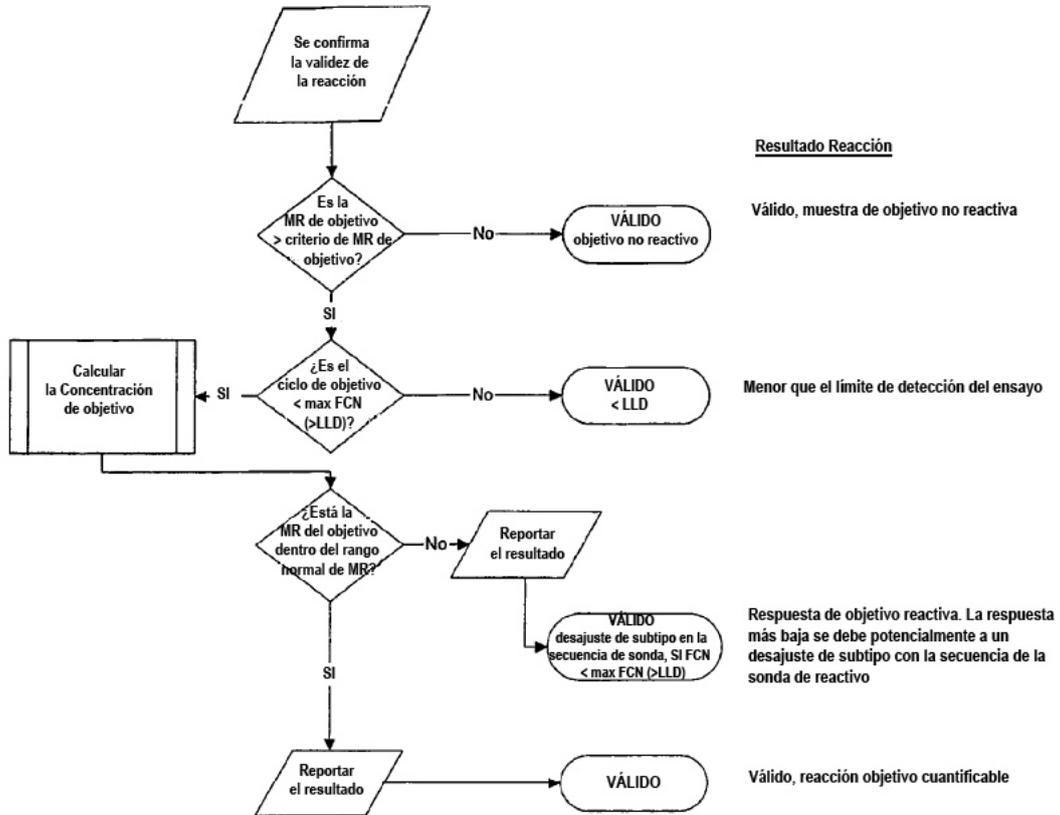


FIG. 26

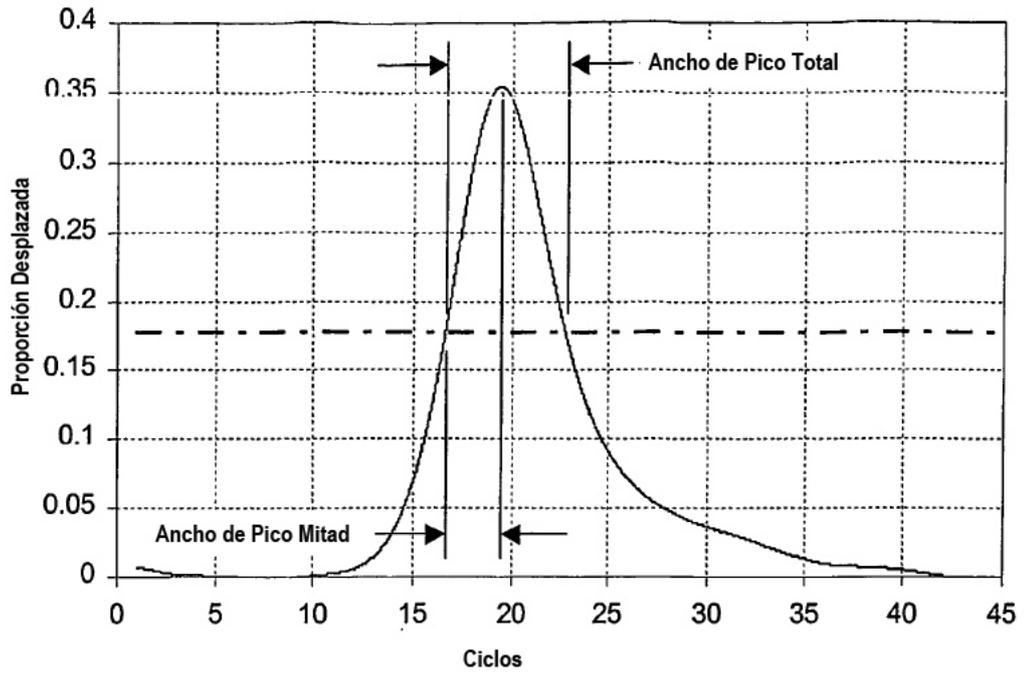


FIG. 27

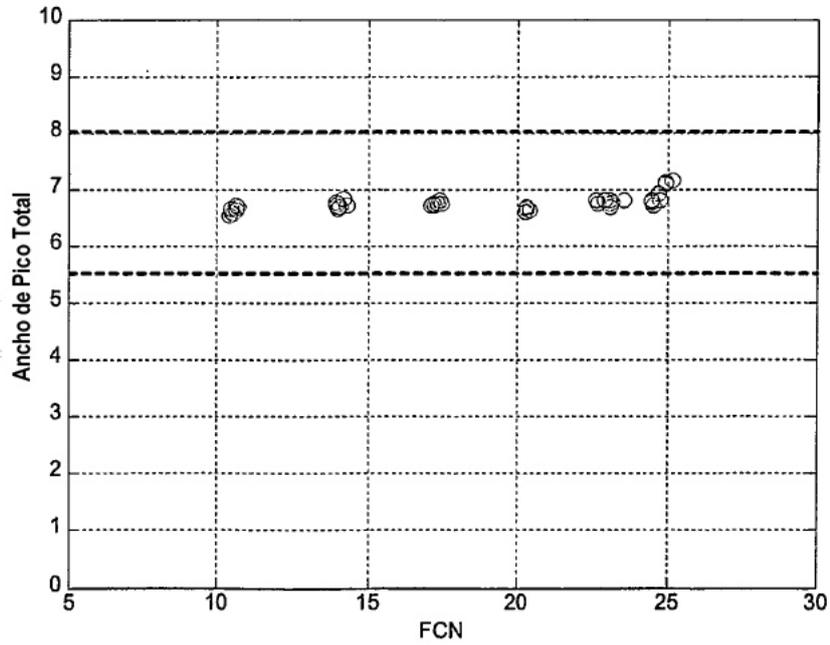
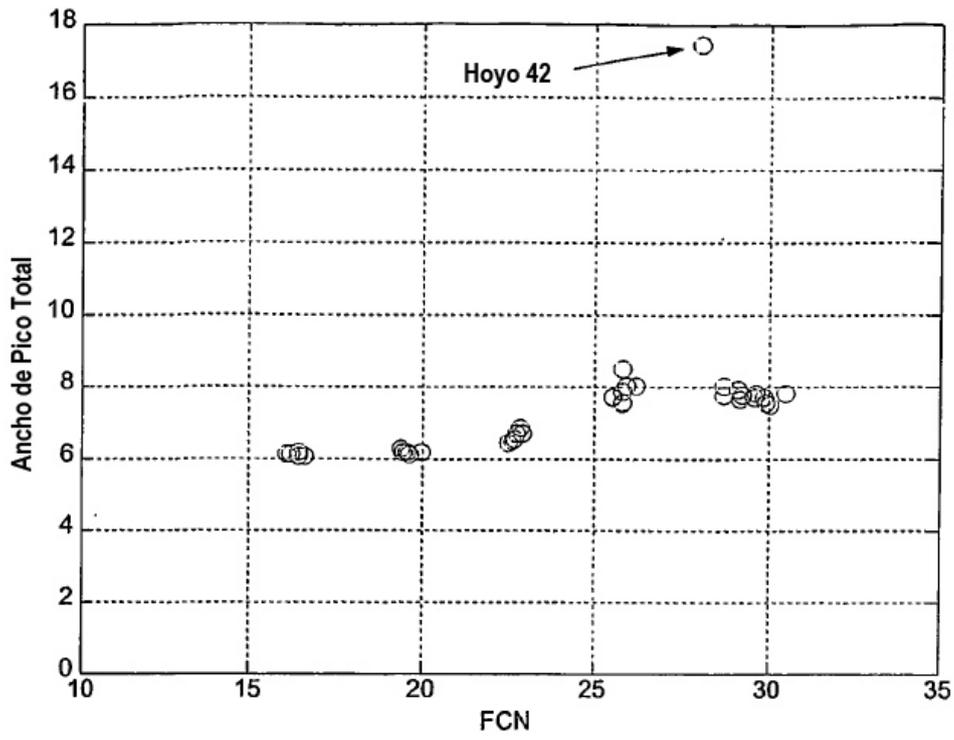


FIG. 28



**FIG. 29**

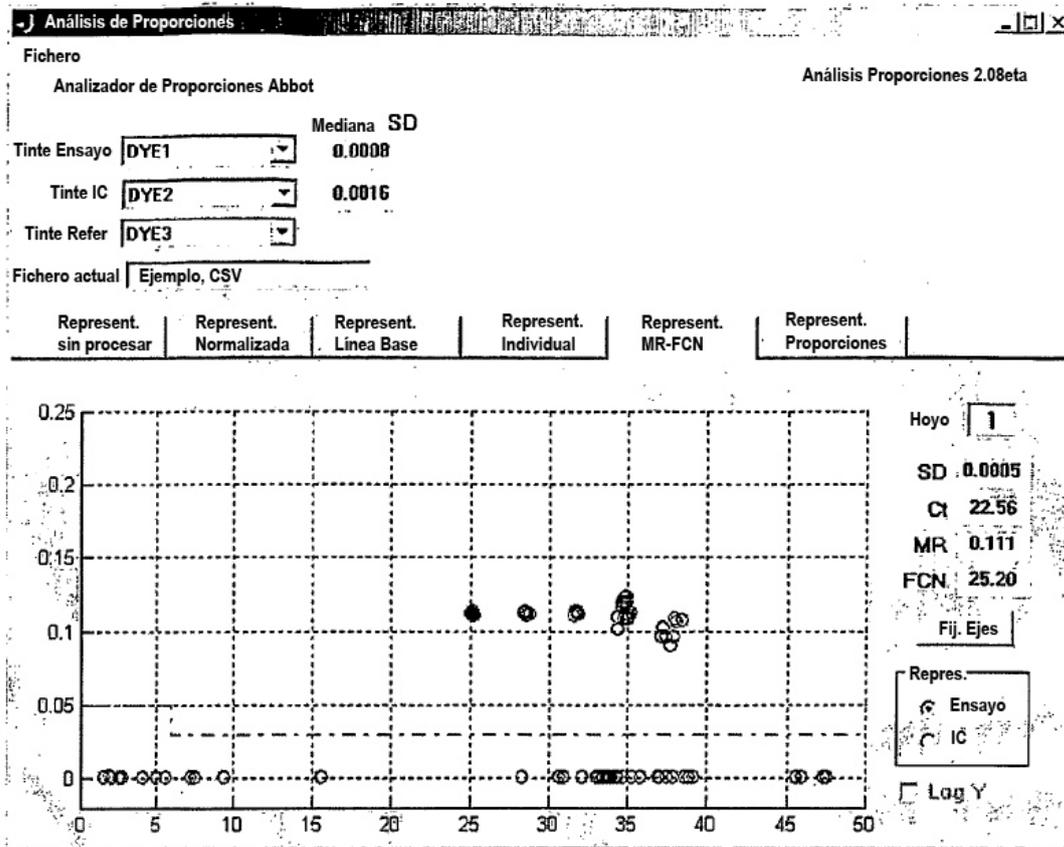


FIG. 30

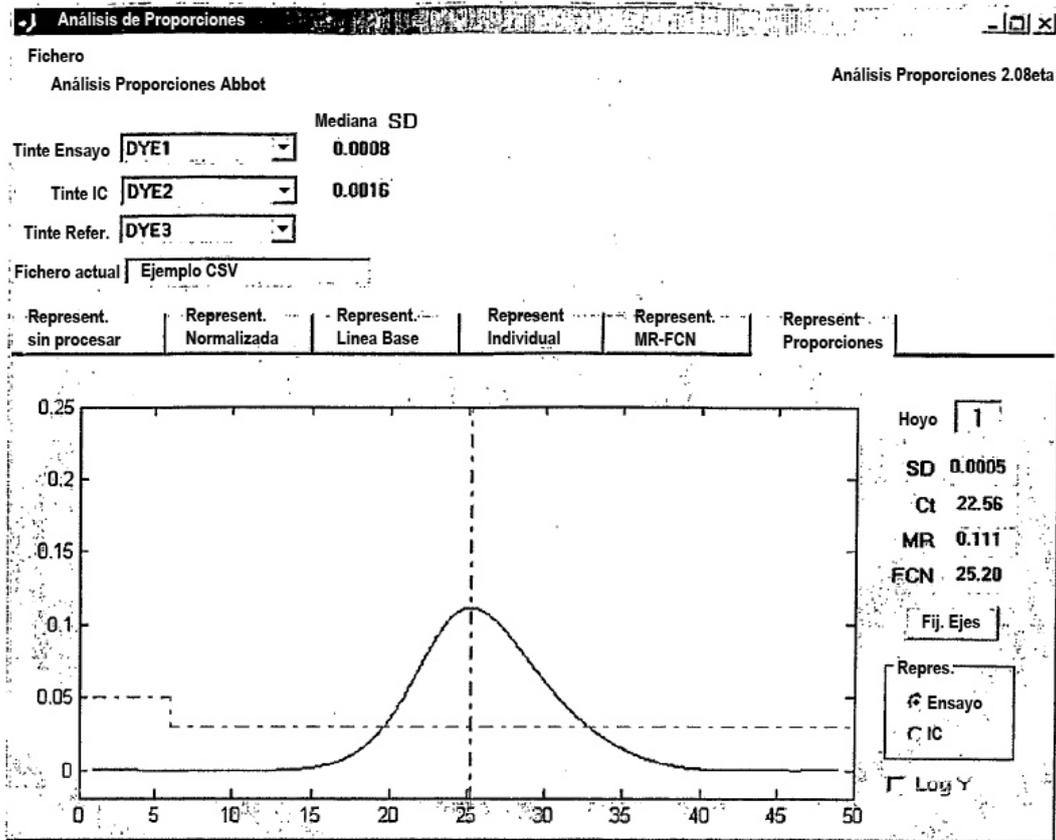


FIG. 31

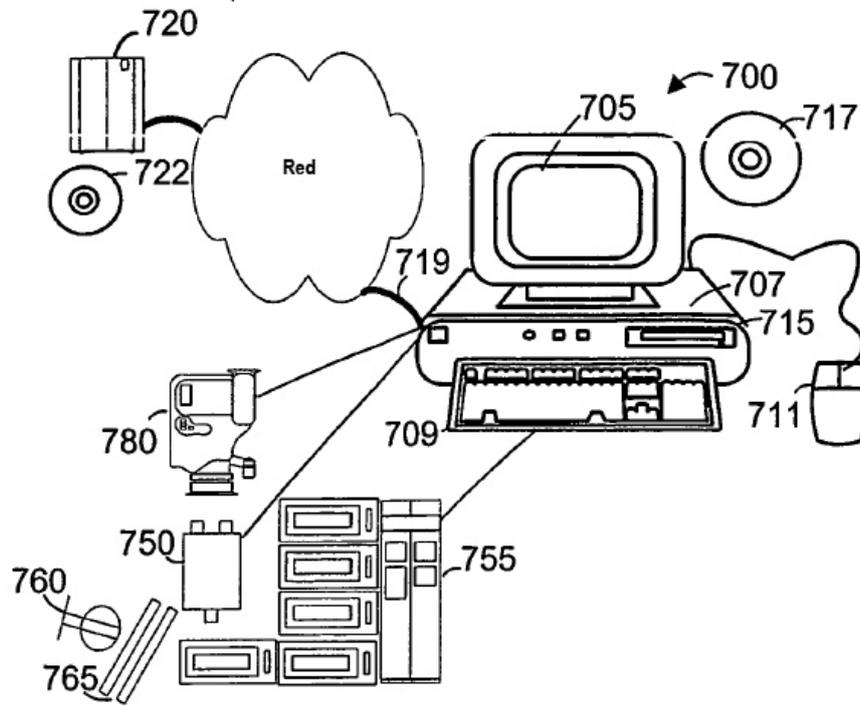


FIG. 32